

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12N 5/00, 5/02, 5/06, 5/08, 5/10	A1	(11) International Publication Number: WO 98/08934 (43) International Publication Date: 5 March 1998 (05.03.98)
(21) International Application Number: PCT/US97/15296 (22) International Filing Date: 2 September 1997 (02.09.97) (30) Priority Data: 60/022,881 30 August 1996 (30.08.96) US Not furnished 22 August 1997 (22.08.97) US Not furnished 29 August 1997 (29.08.97) US (71) Applicant: LIFE TECHNOLOGIES, INC. [US/US]; 9800 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850 (US). (71)(72) Applicants and Inventors: GORFIEN, Stephen, F. [US/US]; 148 Ranch Trail West, Williamsville, NY 14221 (US). FIKE, Richard, M. [US/US]; 9310 Hunting Valley Road, Clarence, NY 14031 (US). DZIMIAN, Joyce, L. [US/US]; 532 Rowley Road, Depew, NY 14043 (US). GODWIN, Glenn, P. [US/US]; 3296 Craig Drive, North Tonawanda, NY 14120 (US). PRICE, Paul, J. [US/US]; 230 Deerwood Lane, Grand Island, NY 14072 (US). EPSTEIN, David, A. [US/US]; 7 Shady Grove Drive, East Amherst, NY 14051 (US). GRUBER, Dale [US/US]; 92 Cheshire Lane, East Amherst, NY 14051 (US). McCCLURE, Don [US/US]; 7816 Mallard Way, Indianapolis, IN 46256 (US).		(74) Agents: ESMOND, Robert, W. et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., Suite 600, 1100 New York Avenue, N.W., Washington, DC 20005-3934 (US). (81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>

(54) Title: SERUM-FREE MAMMALIAN CELL CULTURE MEDIUM, AND USES THEREOF**(57) Abstract**

The present invention provides a cell culture medium formulation that supports the *in vitro* cultivation, particularly in suspension, of mammalian cells, particularly epithelial cells and fibroblast cells, and methods for cultivating mammalian cells in suspension *in vitro*, using these media. The media comprise a basal medium and a polyanionic or polyanionic compound, preferably a polysulfonated or polysulfated compound, and more preferably dextran sulfate. The present invention also provides chemically defined, protein-free eukaryotic cell culture media comprising an iron chelate and zinc, which is capable of supporting the growth (and particularly the high-density growth of mammalian cells) in suspension culture, increasing the level of expression of recombinant protein in cultured cells, and/or increasing virus production in cultured cells.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2000-517188
(P2000-517188A)

(43) 公表日 平成12年12月26日 (2000. 12. 26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
7/02		7/02	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全109頁)

(21) 出願番号 特願平10-511986
(86) (22) 出願日 平成9年9月2日 (1997. 9. 2)
(85) 翻訳文提出日 平成11年3月1日 (1999. 3. 1)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 1 5 2 9 6
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 0 8 9 3 4
(87) 国際公開日 平成10年3月5日 (1998. 3. 5)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 2 2 , 8 8 1
(32) 優先日 平成8年8月30日 (1996. 8. 30)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ライフ テクノロジーズ, インコーポレイ
テッド
アメリカ合衆国 メリーランド 20850,
ロックビル, メディカル センター ドラ
イブ 9800
(72) 発明者 ゴーフーン, スティーブン エフ.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 14221,
ウィリアムスビル, ランチ トレイル ウ
ェスト 148
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無血清哺乳動物細胞培養培地およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物細胞、特に上皮細胞および線維芽細胞のインビトロ培養、特に懸濁液中の培養を支持する細胞培養培地処方物ならびにこれらの培地を用いて、インビトロの懸濁液中の哺乳動物細胞を培養する方法を提供する。この培地は、基本培地およびポリアニオン性またはポリアニオン性化合物、好ましくはポリスルホン化またはポリ硫酸化合物、そしてより好ましくはデキストラン硫酸を含む。本発明はまた、鉄キレートおよび鉛を含む、化学的に規定された、タンパク質を含まない真核生物細胞培養培地を提供し、これは、懸濁培養中の増殖 (特に哺乳動物細胞の高密度増殖) を支持し得、培養細胞中の組換えタンパク質の発現のレベルを増大し、および/または培養細胞中のウイルス産生を増大する。

【特許請求の範囲】

1. インビトロで懸濁物中で哺乳動物細胞を培養する方法であって、以下：

(a)懸濁物中で培養されるべき哺乳動物細胞を得る工程；および

(b)該細胞を、少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含む無血清細胞培養培地と接触させる工程であって、ここで該培地が懸濁物中の該細胞の培養を支持する、工程、
を包含する、方法。

2. 前記ポリアニオン性化合物がポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物である、請求項1に記載の方法。

3. 前記ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸、およびプロテオグリカンからなる群より選択される、請求項2に記載の方法。

4. 前記ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物がデキストラン硫酸である、請求項2に記載の方法。

5. 前記デキストラン硫酸が約5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項4に記載の方法。

6. 前記培地が無タンパク質培地である、請求項1に記載の方法。

7. 前記培地が1×培地処方物である、請求項1に記載の方法。

8. 前記培地処方物が10×濃縮培地処方物である、請求項1に記載の方法。

9. 前記培地が、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上の無機塩、

1つ以上の緩衝化塩、1つ以上の糖、1つ以上の脂質、トランスフェリン（またはトランスフェリン代用物）、およびインスリン（またはインスリン代用物）からなる成分の群より選択される1つ以上の成分をさらに含む、請求項1に記載の方法。

10. 前記培地が、1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチド、および1つ以上の植物ペプチドからなる補充物質

の群より選択される1つ以上の補充物質をさらに含む、請求項9に記載の方法。

11. 前記1つ以上の植物ペプチドが、1つ以上のイネペプチドまたは1つ以上のダイズペプチドである、請求項10に記載の方法。

12. 前記アミノ酸成分が、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、およびL-バリンからなる群より選択される1つ以上のアミノ酸を含む、請求項9に記載の方法。

13. 前記ビタミン成分が、ビオチン、塩化コリン、 $D\text{-Ca}^{++}$ -パントテン酸、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、およびビタミン B_{12} からなる群より選択される1つ以上のビタミンを含む、請求項9に記載の方法。

14. 前記無機塩成分が、1つ以上のカルシウム塩、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 KCl 、1つ以上のマグネシウム塩、1つ以上のマンガン酸塩、 NaCl 、 NaHCO_3 、 Na_2HPO_4 、1つ以上のセレンウム塩、1つ以上のバナジウム塩、および1つ以上の亜鉛塩からなる群より選択される1つ以上の無機塩を含む、請求項9に記載の方法。

15. インビトロで懸濁物中で哺乳動物細胞を培養する方法であって、以下：

(a) 懸濁物中で培養されるべき哺乳動物細胞を得る工程；および

(b) 該細胞を、以下の成分、エタノールアミン、D-グルコース、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸](HEPES)、インスリン、リノール酸、リボ酸、フェノールレッド、PLURONIC F68、プトレシン、ピルビン酸ナトリウム、トランスフェリン、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、ビオチン、塩化コリン、 $D\text{-Ca}^{++}$ -パントテン酸、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、ビタミン

B₁₂、少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物、1つ以上のカルシウム塩、KCl、1つ以上の鉄塩、1つ以上のマグネシウム塩、1つ以上のマンガン酸塩、NaCl、NaHCO₃、Na₂HP0₄、1つ以上のセレンウム塩、1つ以上のバナジウム塩、および1つ以上の亜鉛塩を含む細胞培養培地と接触させる工程であって、

ここで、各成分が、懸濁物中の該細胞の培養を支持する量で存在する、工程、を包含する、方法。

16. 前記ポリアニオン性化合物がポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物である、請求項15に記載の方法。

17. 前記ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸、およびプロテオグリカンからなる群より選択される、請求項16に記載の方法。

18. 前記ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物が、デキストラン硫酸である、請求項17に記載の方法。

19. 前記デキストラン硫酸が、約5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項18に記載の方法。

20. 前記培地が、1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチド、および1つ以上の植物ペプチドからなる群より選択される1つ以上の補充物質をさらに含む、請求項15に記載の方法。

21. 前記1つ以上の植物ペプチドが、1つ以上のイネペプチドまたは1つ以上のダイズペプチドである、請求項20に記載の方法。

22. インビトロで懸濁物中で哺乳動物細胞を培養する方法であって、以下：

(a)懸濁物中で培養されるべき哺乳動物細胞を得る工程；および

(b)該細胞を、少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を有する基本培地を組合せることによって得られる細胞培養培地と接触させる工程であって、ここで該培地が懸濁物中の該細胞の培養を支持する、工程、を包含する、方法。

23. 前記ポリアニオン性化合物がポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物である、請求項22に記載の方法。

24. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸、およびプロテオグリカンからなる群より選択される、請求項23に記載の方法。

25. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸である、請求項23に記載の方法。

26. 前記デキストラン硫酸が、約5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項25に記載の方法。

27. 請求項22に記載の方法であって、ここで前記基本培地が、エタノールアミン、D-グルコース、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸](HEPES)、インスリン、リノール酸、リポ酸、フェノールレッド、PLURONIC F68、プトレシン、ピルビン酸ナトリウム、トランスフェリン、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、ビオチン、塩化コリン、D-Ca⁺⁺-パントテン酸、葉酸、D-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、ビタミンB₁₂、1つ以上のカルシウム塩、1つ以上の鉄塩、KCl、1つ以上のマグネシウム塩、1つ以上のマンガン酸塩、NaCl、NaHCO₃、Na₂HPO₄、1つ以上のセレンウム塩、1つ以上のバナジウム塩、および1つ以上の亜鉛塩からなる群より選択される1つ以上の成分を組み合わせることによって得られ、

ここで、該各成分が、懸濁物中の該細胞の培養を支持する量で添加される、方法。

28. 請求項22に記載の方法であって、前記培地が、前記基本培地と、1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチ

ド、および1つ以上の植物ペプチドからなる群より選択される1つ以上の補充物質とを組み合わせることによって得られる、方法。

29. 前記1つ以上の植物ペプチドが、1つ以上のイネペプチドまたは1つ以上のダイズペプチドである、請求項28に記載の方法。

30. 前記哺乳動物細胞が哺乳動物上皮細胞である、請求項1、15、または22のいずれか1項に記載の方法。

31. 前記哺乳動物上皮細胞が、ケラチノサイト、子宮頸部上皮細胞、気管支上皮細胞、気管上皮細胞、腎上皮細胞、および網膜上皮細胞からなる群より選択される、請求項30に記載の方法。

32. 前記細胞がヒト細胞である、請求項30に記載の方法。

33. 前記ヒト細胞が、293胚腎細胞、HeLa子宮頸部上皮細胞、PER-C6網膜細胞、またはそれらの派生物である、請求項32に記載の方法。

34. 前記ヒト細胞が293胚腎細胞である、請求項33に記載の方法。

35. 前記細胞が正常細胞である、請求項30に記載の方法。

36. 前記細胞が異常細胞である、請求項30に記載の方法。

37. 前記異常細胞が、形質転換細胞、樹立細胞、または疾患組織サンプル由来の細胞である、請求項36に記載の方法。

38. インビトロでの懸濁物中での哺乳動物上皮細胞の培養のためのキットであって、該キットが、1つ以上の容器を含み、ここで、第1の容器が少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含む無血清培養培地を含み、ここで、該培地が懸濁物における該細胞の培養を支持する、キット。

39. インビトロでの懸濁物中での哺乳動物上皮細胞の培養のためのキットであって、該キットが、1つ以上の容器を含み、ここで、第1の容器が、以下の成分、エタノールアミン、D-グルコース、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-

エタンスルホン酸](HEPES)、インスリン、リノール酸、リポ酸、フェノールレッド、PLURONIC F68、プトレシン、ピルビン酸ナトリウム、トランスフェリン、L-

アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、ビオチン、塩化コリン、D-Ca⁺⁺-パントテン酸、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、ビタミンB₁₂、1つ以上のカルシウム塩、KCl、1つ以上の鉄塩、1つ以上のマグネシウム塩、1つ以上のマンガン酸塩、NaCl、NaHCO₃、Na₂HP0₄、1つ以上のセレンウム塩、1つ以上のバナジウム塩、および1つ以上の亜鉛塩を含む細胞培養培地を含み、

ここで、ここで該各成分が、懸濁物中の該細胞の培養を支持する量で存在する、キット。

40. 前記第1の容器中の前記培養培地が、少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物をさらに含む、請求項39に記載のキット。

41. 少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含む第2の容器をさらに含む、請求項39に記載のキット。

42. 前記ポリアニオン性化合物がポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物である、請求項38、40または41のいずれか1項に記載のキット。

43. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸、およびプロテオグリカンからなる群より選択される、請求項42に記載のキット。

44. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸である、請求項42に記載のキット。

45. 前記デキストラン硫酸が、約5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項44に記載のキット。

46. 1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチド、および1つ以上の植物ペプチドからなる群より選択される1つ以上の補充物質を含む1つ以上のさらなる容器をさらに含む、請求項38または

請求項39に記載のキット。

47. 前記1つ以上の植物ペプチドが、1つ以上のイネペプチドまたは1つ以上のダイズペプチドである、請求項46に記載のキット。

48. 少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含む無血清培地を含む組成物であって、ここで、該培養培地がインビトロで懸濁物中の哺乳動物細胞の培養を支持する、組成物。

49. 前記ポリアニオン性化合物がポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物である、請求項48に記載の組成物。

50. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸、およびプロテオグリカンからなる群より選択される、請求項49に記載の組成物。

51. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸である、請求項49に記載の組成物。

52. 前記デキストラン硫酸が、約5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求

項51に記載の組成物。

53. 少なくとも1つのウイルスをさらに含む、請求項48の組成物。

54. 前記ウイルスが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびレトロウイルスからなる群より選択される、請求項53に記載の組成物。

55. 少なくとも哺乳動物上皮細胞をさらに含む、請求項48の組成物。

56. 前記哺乳動物上皮細胞が、ケラチノサイト、子宮頸部上皮細胞、気管支上皮細胞、気管上皮細胞、腎上皮細胞、および網膜上皮細胞からなる群より選択される、請求項55に記載の組成物。

57. 前記細胞がヒト細胞である、請求項55に記載の組成物。

58. 前記ヒト細胞が、293胚腎細胞、HeLa子宮頸部上皮細胞、PER-C6網膜細胞、またはそれらの派生物である、請求項57に記載の組成物。

59. 前記細胞が正常細胞である、請求項55に記載の組成物。

60. 前記細胞が異常細胞である、請求項55に記載の組成物。

61. 前記異常細胞が、形質転換細胞、樹立細胞、または疾患組織サンプル由来の細胞である、請求項60に記載の組成物。

62. 無血清培養培地および少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含む、哺乳動物細胞の懸濁培養において使用するための組成物。

63. 前記ポリアニオン性化合物がポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物である、請求項62に記載の組成物。

64. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸、およびプロテオグリカンからなる群より選択される、請求項63に記載の組成物。

65. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸である、請求項63に記載の組成物。

66. 前記デキストラン硫酸が、約5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項65に記載の組成物。

67. 少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含む、哺乳動物細胞の懸濁培養において使用するための無血清培養培地。

68. ウイルスを産生することにおいて使用するための無血清培養培地であって、該培地が少なくとも1つのポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含み、ここで該培地における懸濁物中で培養されたウイルス感染哺乳動物細胞が、該培地における懸濁物中で培養されない哺乳動物細胞より高いウイルスカ価を生じる、無血清培養培地。

69. 前記ポリアニオン性化合物がポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物である、請求項67または請求項68に記載の培養培地。

70. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸、およびプロテオグリカンからなる群より選択される、請求項69に記載の培

養培地。

71. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸である、請求項69に記載の培養培地。

72. 前記デキストラン硫酸が、約5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項71に記載の培養培地。

73. ウイルスを産生する方法であって、以下の工程、

(a)ウイルスで感染されるべき哺乳動物細胞を得る工程；

(b)該細胞を、ウイルスによる該細胞の感染を促進するに適切な条件下で該ウイルスと接触させる工程；および

(c)該細胞を、該ウイルスの産生を促進するに適切な条件下で、請求項1、15、または22のいずれか1項に記載の方法に従って培養する工程、を包含する、方法。

74. 前記哺乳動物細胞が上皮細胞である、請求項73に記載の方法。

75. 前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項73に記載の方法。

76. 前記ヒト細胞が293胚腎細胞である、請求項75に記載の方法。

77. 前記ウイルスが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはレトロウイルスである、請求項73に記載の方法。

78. 請求項73の方法に従って産生されたウイルス。

79. ポリペプチドを産生する方法であって、以下の工程、

(a)ポリペプチドを産生するために遺伝的に操作された哺乳動物細胞を得る工

程；および

(b)該細胞を、該哺乳動物細胞による該ポリペプチドの発現を補助する条件下で、請求項1、15、または22のいずれか1項に記載の方法に従って培養する工程、を包含する、方法。

80. 前記哺乳動物細胞が上皮細胞である、請求項79に記載の方法。

81. 前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項79に記載の方法。

82. 前記ヒト細胞が293胚腎上皮細胞である、請求項81に記載の方法。

83. 請求項79の方法に従って産生されたポリペプチド。

84. Fe^{2+} キレートおよび Zn^{2+} 塩を含む真核生物細胞培養培地であって、ここで該培地が、懸濁培養における哺乳動物細胞の高密度増殖および／または組換えタンパク質の発現を支持し得る、真核生物細胞培養培地。

85. 前記培地がトランスフェリンもインスリンも含まない、請求項84に記載の真核生物細胞培養培地。

86. 前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巢細胞である、請求項84に記載の真核生物細胞培養培地。

87. 前記培地が1×の培地処方物である、請求項84に記載の真核生物細胞培養培地。

88. 前記培地が濃縮培地処方物である、請求項84に記載の真核生物細胞培養培地。

89. 前記培地が10×の培地処方物である、請求項88に記載の真核生物細胞培養培地。

90. 前記培地処方物が10×より大きい、請求項88に記載の真核生物細胞培養培地。

91. 前記 Fe^{2+} の濃度が約0.00028～0.011g/Lであり、そして前記 Zn^{2+} の濃度が約0.00007～0.00073g/Lである、請求項84に記載の真核生物細胞培養培地。

92. 前記 Fe^{2+} の濃度が約0.0011g/Lであり、そして前記 Zn^{2+} の濃度が約0.000354g/Lである、請求項91に記載の真核生物細胞培養培地。

93. ポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物をさらに含む化合物であって請求項84に記載の真核生物細胞培養培地であって、ここで、該ポリアニオン性化合物もしくはポリカチオン性化合物が細胞凝集を防止し、そして／または組換えタンパク質発現のレベルを増大させるに十分な量で存在する、真核生物細胞培養培地。

94. 前記ポリアニオン性化合物がポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物である、請求項93に記載の真核生物細胞培養培地。

95. 請求項94に記載の真核生物細胞培養培地であって、ここで、前記ポリス

ルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸、およびプロテオグリカンからなる群より選択される、真核生物細胞培養培地。

96. 前記ポリスルホン化またはポリ硫酸化合物がデキストラン硫酸である、請求項95に記載の真核生物細胞培養培地。

97. 前記デキストラン硫酸が5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項96に記載の真核生物細胞培養培地。

98. 以下からなる群から選択される1つ以上の成分をさらに含む、請求項84または93に記載の真核生物細胞培養培地であって：L-アルギニン、L-アスパラギン・H₂O、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン・HCl、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-シスチン・2HCl、Na₂HP0₄、ピリドキシン・HCl、チアミン・HCl、グルタチオン、硫酸銅・7H₂O、塩化カドミウム・5H₂O、塩化コバルト・2H₂O、塩化第一スズ・2H₂O、硫酸マンガン・H₂O、硫酸ニッケル・6H₂O、メタバナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸アンモニウム・4H₂O、酢酸バリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、硫酸クロム、フッ化ナトリウム、硝酸銀、塩化ルビジウム、塩化ジルコニル、塩化アルミニウム、二酸化ゲルマニウム、四塩化チタン、メタケイ酸ナトリウム、塩化マグネシウム(無水)、D-パントテン酸カルシウム、硝酸カルシウム・4H₂O、塩化カリウム、アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩、pluronic F68 10%溶液、Na₂HP0₄、D-グルコース、葉酸、リボフラビン、ビオチン、塩化コリン、ナイアシンアミド、L-イノシトール、ピルビン酸ナトリウム、ビタミンB-12、β-メルカプトエタノール、パラ-アミノ安息香酸、β-グリセロリン酸、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン・HCl、スペルミン、プトレシン・2HCl、モノチオグリセロール、および重炭酸ナトリウム；

ここで、該成分の各々が、懸濁培養中のチャイニーズハムスター卵巣細胞の高密度増殖、および/または組換えタンパク質の発現を支持する量で存在する、培

養培地。

99. 真核生物用培地とともに、硫酸第一鉄・EDTAおよび $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を組み合わせるにより得た真核生物細胞培養培地であって、該硫酸第一鉄・EDTAお

よび該 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の各々が、懸濁培養中のチャイニーズハムスター卵巣細胞の高密度増殖を支持する量で存在する、培養培地。

100. ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物をさらに含み、該ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物が、細胞凝集を防ぐに、および/または組換えタンパク質発現のレベルを増加するに十分な量で存在する、請求項99に記載の真核生物細胞培養培地。

101. 前記ポリアニオン性化合物が、ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物である、請求項100に記載の真核生物細胞培養培地。

102. 前記ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸およびプロテオグリカンからなる群から選択される、請求項101に記載の真核生物細胞培養培地。

103. 前記ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物が、デキストラン硫酸である、請求項102に記載の真核生物細胞培養培地。

104. 前記デキストラン硫酸が、5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項103に記載の真核生物細胞培養培地。

105. 以下からなる群選択される1つ以上の成分をさらに含む請求項99または100に従って得られる真核生物細胞培養培地であって：L-アルギニン、L-アスパラギン・ H_2O 、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン・ HCl 、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-シスチン・ 2HCl 、 Na_2HPO_4 、ピリドキシン・ HCl 、チアミン・ HCl 、グルタチオン、硫酸銅・ $5\text{H}_2\text{O}$ 、塩化カドミウム・ $5\text{H}_2\text{O}$ 、

塩化コバルト・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、塩化第一スズ・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、硫酸マンガン・ H_2O 、硫酸ニッケ

ル・6H₂O、メタバナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸アンモニウム・4H₂O、酢酸バリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、硫酸クロム、フッ化ナトリウム、硝酸銀、塩化ルビジウム、塩化ジルコニル、塩化アルミニウム、二酸化ゲルマニウム、四塩化チタン、メタケイ酸ナトリウム、塩化マグネシウム(無水)、D-パントテン酸カルシウム、硝酸カルシウム・4H₂O、塩化カリウム、アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩、pluronic F68 10%溶液、Na₂HP0₄、D-グルコース、葉酸、リボフラビン、ビオチン、塩化コリン、ナイアシンアミド、i-イノシトール、ピルビン酸ナトリウム、ビタミンB-12、β-メルカプトエタノール、パラアミノ安息香酸、β-グリセロリン酸、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン・HCl、スペルミン、プトレシン・2HCl、モノチオグリセロール、および重炭酸ナトリウム；

ここで、該成分の各々が、懸濁培養中のチャイニーズハムスター卵巣細胞の高密度増殖、および/または組換えタンパク質の発現を支持する量で存在する、培養培地。

106. 懸濁培養中で哺乳動物細胞を高密度まで培養する、および/または組換えタンパク質を発現する方法であって、

(a) 該細胞を、請求項84に記載の真核生物細胞培養培地と接触させる工程；ここで、前記Fe²⁺キレートおよび前記Zn²⁺塩の各々が、培養中に哺乳動物細胞の増殖を支持する量で存在する工程；および

(b) 該哺乳動物細胞を、高密度までの該細胞の増殖および/または該組換えタンパク質の発現を支持するに適切な条件下で培養する工程、を包含する、方法。

107. ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物をさらに含み、該ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物が、細胞凝集を防ぐに、および/または組換えタンパク質発現のレベルを増加するに十分な量で存在する、請求項106に記載の方法。

108. 前記ポリアニオン性化合物が、ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物である、請求項107に記載の方法。

109. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸およびプロテオグリカンからなる群から選択される、請求項108に記載の方法。

110. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸である、請求項109に記載の方法。

111. 前記デキストラン硫酸が、5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項110に記載の方法。

112. 前記真核生物細胞培養培地が、以下からなる群から選択される1つ以上の成分をさらに含む、請求項106または107に記載の方法であって：L-アルギニン、L-アスパラギン・ H_2O 、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン・HCl、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-シスチン・ $2HCl$ 、 Na_2HPO_4 、ピリドキシン・HCl、チアミン・HCl、グルタチオン、硫酸銅・ $5H_2O$ 、塩化カドミウム・ $5H_2O$ 、塩化コバルト・ $2H_2O$ 、塩化第一スズ・ $2H_2O$ 、硫酸マンガン・ H_2O 、硫酸ニッケル・ $6H_2O$ 、メタバナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸アンモニウム・ $4H_2O$ 、酢酸バリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、硫酸クロム、フッ化ナトリウム、硝酸銀、塩化ルビジウム、塩化ジルコニル、塩化アルミニウム、二酸化ゲルマニウム、四塩化チタン、メタケイ酸ナトリウム、塩化マグネシウム（無水）、D-パントテン酸カルシウム、硝酸カルシウム・ $4H_2O$ 、塩化カリウム、アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩、pluronic F68 10%溶液、 Na_2HPO_4 、D

-グルコース、葉酸、リボフラビン、ビオチン、塩化コリン、ナイアシンアミド、 α -イノシトール、ピルビン酸ナトリウム、ビタミンB-12、 β -メルカプトエタノール、パラ-アミノ安息香酸、 β -グリセロリン酸、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン・HCl、スペルミン、プトレシン・ $2HCl$ 、モノチオグリセロール、および重炭酸ナトリウム；

ここで、該成分の各々が、懸濁培養中のチャイニーズハムスター卵巣細胞の高

密度増殖、および/または組換えタンパク質の発現を支持する量で存在する、方法。

113. 懸濁培養中のチャイニーズハムスター卵巣細胞を高密度まで増殖させる改良された真核生物細胞培養培地であって、該改良が、インスリンを Zn^{2+} 塩で置換すること、および/またはトランスフェリンを Fe^{2+} キレートで置換すること、および/またはトランスフェリンを Fe^{3+} キレートで置換することを含む、培養培地。

114. ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物をさらに含み、該ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物が、細胞凝集を防ぐに、および/または組換えタンパク質発現のレベルを増加するに十分な量で存在する、請求項113に記載の真核生物細胞培養培地。

115. 前記ポリアニオン性化合物が、ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物である、請求項114に記載の真核生物細胞培養培地。

116. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸およびプロテオグリカンからなる群から選択される、請求項115に記載の真核生物細胞培養培地。

117. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸である、請求項116に記載の真核生物細胞培養培地。

118. 前記デキストラン硫酸が、5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項117に記載の真核生物細胞培養培地。

119. 前記 Fe^{2+} または Fe^{3+} が存在する場合の濃度が、約0.00028~0.011g/Lであり、そして前記 Zn^{2+} が存在する場合の濃度が、約0.00007~0.00073g/Lである、請求項113に記載の真核生物細胞培養培地。

120. 前記 Fe^{2+} または Fe^{3+} が存在する場合の濃度が、約0.0011g/Lであり、そして前記 Zn^{2+} が存在する場合の濃度が、約0.000354g/Lである、請求項119に記載の真核生物細胞培養培地。

121. 以下からなる群から選択される1つ以上の成分をさらに含む、請求項

113または114に記載の真核生物細胞培養培地であって：L-アルギニン、L-アスパラギン・ H_2O 、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン・ HCl 、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-シスチン・ $2HCl$ 、 Na_2HPO_4 、ピリドキシン・ HCl 、チアミン・ HCl 、グルタチオン、硫酸銅・ $5H_2O$ 、塩化カドミウム・ $5H_2O$ 、塩化コバルト・ $2H_2O$ 、塩化第一スズ・ $2H_2O$ 、硫酸マンガン・ H_2O 、硫酸ニッケル・ $6H_2O$ 、メタバナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸アンモニウム・ $4H_2O$ 、酢酸バリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、硫酸クロム、フッ化ナトリウム、硝酸銀、塩化ルビジウム、塩化ジルコニル、塩化アルミニウム、二酸化ゲルマニウム、四塩化チタン、メタケイ酸ナトリウム、塩化マグネシウム(無水)、D-パントテン酸カルシウム、硝酸カルシウム・ $4H_2O$ 、塩化カリウム、アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩、pluronic F68 10%溶液、 Na_2HPO_4 、D-グルコース、葉酸、リボフラビン、ビオチン、塩化コリン、ナイアシンアミド、i-イノシトール、ピルビン酸ナトリウム、ビタミンB-12、 β -メルカプトエタ

ノール、パラ-アミノ安息香酸、 β -グリセロリン酸、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン・ HCl 、スペルミン、プトレシン・ $2HCl$ 、モノチオグリセロール、および重炭酸ナトリウム；

ここで、該成分の各々が、懸濁培養中のチャイニーズハムスター卵巣細胞の高密度増殖、および/または組換えタンパク質の発現を支持する量で存在する、培養培地。

122. 懸濁培養中の哺乳動物細胞を高密度まで培養する改良された方法であって、該改良が、

(a) 該細胞を、請求項84に記載の真核生物細胞培養培地と接触させる工程であって、前記 Fe^{2+} キレートおよび前記 Zn^{2+} 塩の各々が、培養中の哺乳動物細胞の高密度増殖を支持する量で存在する、工程；および

(b) 該哺乳動物細胞を、該細胞の高密度増殖を支持するに適切な条件下で培養する工程、

を包含する、方法。

123. ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物をさらに含み、該ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物が、細胞凝集を防ぐに、および/または組換えタンパク質発現のレベルを増加するに十分な量で存在する、請求項122に記載の方法。

124. 前記ポリアニオン性化合物が、ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物である、請求項123に記載の方法。

125. 前記ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸およびプロテオグリカンからなる群から選択される、請求項124に記載の方法。

126. 前記ポリスルホン化化合物またはポリ硫酸化化合物が、デキストラン硫酸である、請求項125に記載の方法。

127. 前記デキストラン硫酸が、5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項126に記載の方法。

128. 前記真核生物細胞培養培地が、以下からなる群から選択される1つ以上の成分をさらに含む請求項122または123に記載の方法であって：L-アルギニン、L-アスパラギン・ H_2O 、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン・HCl、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-シスチン・2HCl、 Na_2HPO_4 、ピリドキシン・HCl、チアミン・HCl、グルタチオン、硫酸銅・ $5H_2O$ 、塩化カドミウム・ $5H_2O$ 、塩化コバルト・ $2H_2O$ 、塩化第一スズ・ $2H_2O$ 、硫酸マンガン・ H_2O 、硫酸ニッケル・ $6H_2O$ 、メタバナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸アンモニウム・ $4H_2O$ 、酢酸バリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、硫酸クロム、フッ化ナトリウム、硝酸銀、塩化ルビジウム、塩化ジルコニル、塩化アルミニウム、二酸化ゲルマニウム、四塩化チタン、メタケイ酸ナトリウム、塩化マグネシウム(無水)、D-パントテン酸カルシウム、硝酸カルシウム・ $4H_2O$ 、塩化カリウム、

アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩、pluronic F68 10%溶液、 Na_2HPO_4 、D-グルコース、葉酸、リボフラビン、ビオチン、塩化コリン、ナイアシンアミド、i-イノシトール、ピルビン酸ナトリウム、ビタミンB-12、 β -メルカプトエタノール、パラ-アミノ安息香酸、 β -グリセロリン酸、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン・HCl、スペルミン、プトレシン・2HCl、モノチオグリセロール、および重炭酸ナトリウム；

ここで、該成分の各々が、懸濁培養中のチャイニーズハムスター卵巣細胞の高密度増殖を支持する量で存在する、方法。

129. 懸濁培養中の哺乳動物上皮細胞をインビトロで培養するためのキット

であって、1つ以上の容器を備え、第1の容器が Fe^{2+} キレートおよび Zn^{2+} 塩を含む培地を含み、該培地が懸濁培養中の哺乳動物細胞の高密度増殖および/または組換えタンパク質の発現を支持し得る、キット。

130. 前記培地が、トランスフェリンまたはインスリンのいずれをも含まない、請求項129に記載のキット。

131. 前記哺乳動物細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である、請求項130に記載のキット。

132. 前記第1の容器が、以下からなる群から選択される1つ以上の成分をさらに含む請求項129に記載のキットであって：L-アルギニン、L-アスパラギン・ H_2O 、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン・HCl、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-シスチン・2HCl、 Na_2HPO_4 、ピリドキシン・HCl、チアミン・HCl、グルタチオン、硫酸銅・ $7\text{H}_2\text{O}$ 、塩化カドミウム・ $5\text{H}_2\text{O}$ 、塩化コバルト・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、塩化第一スズ・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、硫酸マンガン・ H_2O 、硫酸ニッケル・ $6\text{H}_2\text{O}$ 、メタバナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸アンモニウム・ $4\text{H}_2\text{O}$ 、酢酸バリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、硫酸クロム、フッ化ナトリウム、硝酸銀、塩化ルビジウム、塩化ジルコニル、塩化アルミニウム、二酸化ゲルマニウム、四塩化チタン、メタケイ酸ナトリウム、塩化マグネシウム(無水)、D-パントテン

酸カルシウム、硝酸カルシウム・ $4\text{H}_2\text{O}$ 、塩化カリウム、アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩、pluronic F68 10%溶液、 Na_2HPO_4 、D-グルコース、葉酸、リボフラビン、ビオチン、塩化コリン、ナイアシンアミド、i-イノシトール、ピルビン酸ナトリウム、ビタミンB-12、 β -メルカプトエタノール、パラ-アミノ安息香酸、 β -グリセロリン酸、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン・ HCl 、スペルミン、プトレシン・ 2HCl 、モノチオグリセロール、および重炭酸ナトリウム；

ここで、該成分の各々が、懸濁培養中のチャイニーズハムスター卵巣細胞の高密度増殖、および/または組換えタンパク質の発現を支持する量で存在する、キット。

133. 前記第1の容器中の前記培地が、少なくとも1つのポリアニオン性またはポリカチオン性化合物をさらに含む、請求項132に記載のキット。

134. 少なくとも1つのポリアニオン性またはポリカチオン性化合物を含む第2の容器をさらに備える、請求項132に記載のキット。

135. 前記ポリアニオン性化合物が、ポリスルホン化またはポリ硫酸化合物である、請求項132、133、または134のいずれか1つに記載のキット。

136. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペントサン硫酸およびプロテオグリカンからなる群から選択される、請求項135に記載のキット。

137. 前記ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物が、デキストラン硫酸である、請求項136に記載のキット。

138. 前記デキストラン硫酸が、5,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項137に記載のキット。

139. 前記培地が、リノール酸、リボ酸、フェノールレッド、PLURONICF68、プトレシン、ピルビン酸ナトリウムをさらに含み、前記緩衝化塩がN-[2-ヒドロキシエチル]-ピペラジン-N'-[2-エンタスルホン酸] (HEPES)であり、そ

して前記糖がD-グルコースである、請求項9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

無血清哺乳動物細胞培養培地およびその使用

発明の分野

本発明は、一般に、細胞培養培地処方物に関する。具体的には、本発明は、懸濁液中での哺乳動物細胞のインビトロ培養を容易にする、無血清、低タンパク質または無タンパク質の規定された細胞培養培地処方物を提供する。本発明の培養培地は、上皮細胞（例えば、293ヒト胚性腎臓細胞）および線維芽細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞）の懸濁培養に特に適切である。

発明の背景

細胞培養培地

インビトロでの哺乳動物細胞培養の要件は、基本的な栄養物質に加えて、複雑な一連の増殖因子(Werner, R. G. ら、Mammalian Cell Cultures Part I: Characterization, morphology and metabolism, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 43:1134-1139(1993))を含む。通常、これらは、動物血清または動物供給源由来のタンパク質画分を供給することによって、培養培地に添加される。しかし、これらの化学的に規定されていない混合物は、ロットごとに異なる組成を示す。このような混合物はまた、混入物(ウイルスおよびマイコプラズマを含む)の潜在的な供給源を代表する。工業的規模での生産のためには、補充物の高価格および後続の加工処理の困難さが、さらに考慮すべき事項である。

細胞培養培地は、制御された人工的なインビトロ環境下での細胞の維持および成長(増殖)に必要な栄養素を提供する。細胞培養培地の特徴および組成は、特定の細胞要求に依存して変化する。重要なパラメータには浸透圧モル濃度、pH、および栄養素処方が含まれる。

培地処方物は、多くの細胞タイプ（動物、植物および細菌細胞を含む）を培養するために使用されてきた。培養培地中で培養される細胞は、利用可能な栄養素を分解代謝し、そして有用な生物学的物質(例えば、ウイルス、モノクローナル抗

体、ホルモン、増殖因子など)を産生する。このような産物は治療的適用を有し

、そして組換えDNA技術の出現と共に、細胞は、大量の多くのこれらの産物を産生するよう操作され得る。したがって、インビトロでの細胞培養が可能であることは、細胞生理学の研究に重要であるだけでなく、さもなければ費用効果的な手段によって入手し得ない有用な物質の産生に必要である。

細胞培養培地処方物は文献に十分に報告されており、多くの培地は市販されている。初期の細胞培養研究において、培地処方物は、血液の化学組成および物理化学的特性(例えば、浸透圧モル濃度、pHなど)に基づいており、そして「生理学的溶液」と呼ばれた(Ringer, S., J. Physiol., 3:380-393(1880); Waymouth, C., Cells and Tissues in Culture, 第1巻, Academic Press, London, 99-142頁(1965); Waymouth, C., In Vitro 6:109-127(1970))。しかし、哺乳動物の身体の異なる組織における細胞は、酸素/二酸化炭素分圧ならびに栄養素、ビタミン、および微量元素の濃度に関して、異なる微小環境に曝される。したがって、異なる細胞タイプインビトロ培養の成功には、しばしば、異なる培地処方物の使用が要求される。細胞培養培地の代表的な成分には、アミノ酸、有機および無機の塩、ビタミン、微量金属、糖、脂質、および核酸が含まれ、これらのタイプおよび量は、所定の細胞または組織タイプの特定要件に依存して変化し得る。

代表的には、細胞培養培地処方物は、ウシ胎児血清(FBS)(10~20%v/v)または動物の胚、器官もしくは腺に由来する抽出物(0.5~10%v/v)のような未規定成分を含む、広範囲の添加物を補充される。FBSは動物細胞培養培地において最も一般的に適用される補充物であるが、他の血清供給源(新生児ウシ、ウマ、およびヒトを含む)もまた、日常的に使用される。培養培地の補充のための抽出物を調製するために使用されてきている器官または腺は、顎下腺(Cohen, S., J. Biol. Chem. 237:1555-1565(1961))、下垂体(Peehl, D. M. および Yam, R. G., In Vitro, 16:516-525(1980); 米国特許第4,673,649号)、視床下部(Maciag, T. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5674-5678(1979); Gilchrest, B. A. ら, J. Cell. Physiol. 120:377-383(1984))、網膜(Barretault, D. ら, Differentiation 18:29-42(1981))、および脳(Maciag, T. ら, Science 211:1452-1454(1981))を含む。これらの型の化学的には規定されていない補充物は、いくつかの有用な機能を、細胞培

養培地において、果たす (Lambert, K. J. ら、Animal Cell Biotechnology, 第一巻、Spier, R. E. ら編、Academic Press New York、85～122頁(1985))。例えば、これらの補充物は、不安定な、または水に不溶性の栄養素のためのキャリアまたはキレート剤を提供する；毒性部分に結合し、そして中和する；ホルモンおよび増殖因子、プロテアーゼインヒビターおよびしばしば未確認または未規定の必須な低分子量栄養素を提供する；そして物理的ストレスおよび損傷から細胞を防御する。従って、血清または器官／腺抽出物は、比較的低コストの補充物として一般に使用され、動物細胞の培養に最適な培養培地を提供する。

不幸なことに、血清または器官／腺抽出物の組織培養適用における使用は、いくつかの欠点を有する (Lambert, K. J. ら、Animal Cell Biotechnology、第1巻、Spier, R. E. ら編、Academic Press New York、85～122頁(1985))。例えば、これらの補充物および血清の化学的組成は、単一の製造者からでさえロット毎に異なる。補充物はまた、感染因子 (例えば、マイコプラズマおよびウイルス) に汚染されてい得、これは、培養細胞の健康および最終産物の品質を重篤に損ない得る。規定されていない成分 (例えば、血清または動物抽出物) の使用はまた、培養細胞の栄養要求性およびホルモン要求性の真の規定および解明を妨げ、従って、制御された方法で、特定の増殖因子または栄養素の、培養における細胞増殖および分化への影響を研究する能力を消滅させる。さらに、規定されていない補充物は、研究者が異常な増殖および分化ならびに培養細胞中における疾患に関連する変化を研究することを妨げる。最後に、そして生物学的物質の工業的生産において細胞培養培地に使用することについて最も重要なことに、培養培地の血清および器官／腺抽出物補充は、血清または抽出物タンパク質の非特異的な共精製物に起因して、培養培地からの所望の物質の精製を複雑化し得、そしてそのコストを増加させ得る。

規定培地

血清を補充した培地中で増殖した細胞にみられる発現のレベルと比較して、改善されたレベルの組換えタンパク質発現が、無血清培地で増殖した細胞から得られる (Battista, P. J. ら、Am. Biotech. Lab, 12:64-68(1994))。しかし、無血清培

地は、1つ以上の種々の動物由来成分（アルブミン、フェチュイン、種々のホルモン、および他のタンパク質を含む）をさらに含み得る。タンパク質またはペプチドの存在は、組換えタンパク質の精製を困難にし、時間をとらせ、そして高価にする。

血清または器官／腺抽出物の使用のこれらの欠点を克服するために、多数のいわゆる「規定された」培地が開発されている。これらの培地は、しばしば単一の細胞型の培養を支持するために特異的に処方されるが、規定されていない補充物を含まず、そしてその代わり、精製された、増殖因子、タンパク質、リポタンパク質、および血清または抽出補充物により通常提供される他の物質の規定量を組み込んでいる。このような培養培地における成分（およびそれらの濃度）は、正確に知られているので、これらの培地は、一般に「規定培養培地」と言及される。しばしば、「規定培養培地」は、用語「無血清培地」または「SFM」と交換可能に使用される。内皮細胞、ケラチノサイト、単球／マクロファージ、リンパ球、造血幹細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、または肝細胞の培養を支持するように設計された処方物のような多数のSFM処方物が市販されており、これらは、Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland)から入手可能である。しかし、SFMと規定培地との間の差違は、SFMが、血清およびタンパク質画分（例えば、血清アルブミン）を欠くが、必ずしも器官／腺抽出物のような規定されていない他の成分を欠いていない培地であることである。実際、報告されているかまたは市販されているいくつかのSFMは、このような規定されていない成分（ケラチノサイトのインビトロ培養を支持するいくつかの処方物を含む）を含有する（Boyce, S. T. およびHam, R. G., J. Invest. Dermatol. 81:33(1983); Wille, J. J. ら J. Cell. Physiol. 121:31(1984); Pittelkow, M. R., およびScott, R. E., Mayo Clin. Proc. 61:771(1986); Pirlsi, L. ら, J. Virol. 61:1061(1987); Shipley, G. D., およびPittelkow, M. R., Arch. Dermatol. 123:1541(1987); Shipley, G. D. ら, J. Cell. Physiol. 138:511-518(1989); Daley, J. P. ら, FOCUS(GIBCO/LTI)12:68(1990); 米国特許第4,673,649号および同第4,940,666号)。従って、SFMは、用語の真の定義において規定培地とみなされ得ない。

規定培地は一般に、使用者にとっていくつかの異なる利点を提供する。例えば

規定培地の使用は、細胞を血清含有培地または抽出物含有培地中で培養する場合にマスクされ得る、細胞生理学に対する特定の増殖因子または他の培地成分の影響の研究を容易にする。さらに、規定培地は、代表的には、血清または抽出物を含む培地よりはるかに低量のタンパク質を含む（実際、規定培地は、しばしば、「低タンパク質培地」と呼ばれる）。これは、規定培地において培養した細胞により産生される生物学的物質の精製をはるかに容易にし、そしてより対費用効果を高くする。

本質的にビタミン、アミノ酸、有機および無機の塩、ならびに緩衝液からなる、いくつかの極めて単純な規定培地が細胞培養に使用されてきている。しかし、このような培地（しばしば、「基本培地」と呼ばれる）は、通常、ほとんどの動物細胞に必要とされる栄養内容が重篤に欠乏している。従って、ほとんどの規定培地は、基本培地中に追加成分を取り込ませ、培地をより栄養価の高い複合物にするが、培地の無血清で低タンパク質の内容を維持する。このような成分の例は、ウシ由来血清アルブミン（BSA）またはヒト由来血清アルブミン（HSA）；天然供給源（動物）または組換え供給源に由来する特定の増殖因子（例えば、EGFまたはFGF）；脂質（例えば、脂肪酸、ステロール、およびリン脂質）；脂質誘導体および脂質複合体（例えば、ホスホエタノールアミン、エタノールアミン、およびリポタンパク質）；タンパク質ホルモンおよびステロイドホルモン（例えば、インスリン、ヒドロコルチゾン、およびプロゲステロン）；ヌクレオチド前駆体；および特定の微量元素を含む（Waymouth, C., *Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology*; 第一巻、*Methods for Preparation of Media, Supplements, and Substrata for Serum-Free Animal Cell Culture*, Barnes, D.W. ら編、New York: Alan R. Liss Inc., 23～68頁（1984）、およびGospodarowicz, D., 同、69～86頁（1984）に概説される）。

しかし、細胞培養培地における動物タンパク質補充物の使用はまた、特定の欠点を有する。例えば、培養培地および／またはそれから精製された産物が、特に補充物が培養される細胞の供給源とは異なる動物由来である場合に、免疫原性で

あり得るという危険が存在する。治療薬として使用される生物学的物質が、このような培養培地から精製される場合、特定量のこれらの免疫原性タンパク質また

はペプチドが同時精製され得、そしてこのような治療薬を受ける動物において免疫学的反応（アナフィラキシーまで、そしてこれを含む）を誘導し得る。

この潜在的な問題を回避するために、培養される細胞と同一の種に由来する補充物が使用され得る。例えば、ヒト細胞の培養は、HSAを補充物として使用することにより容易にされ得る一方、ウシ細胞の培養のための培地は、その代わりにBSAを使用する。しかし、このアプローチは、培養培地中に夾雑物および不定の病原体（例えば、HSA調製物由来のクロイツフェルトーヤコブ病（CJD）ウイルス、またはBSA調製物由来のウシ海綿状脳症（「狂牛病」）ウイルス）を導入する危険を伴い、これは、明らかに、動物およびヒト治療薬の調製物におけるそのような培地の使用に負に影響し得る。実際、このような安全性の理由のため、バイオテクノロジー産業および政府当局は、このような病原体を含み得る動物由来タンパク質を含む細胞培養培地の使用を、ますます規制するか、思いとどまるか、そして禁止さえもしつつある。

非動物ペプチド補充物

SFM中の動物タンパク質の使用の限界を克服するために、いくつかの試みが、動物タンパク質を全く含まない動物細胞培養培地を構築するためになされてきた。例えば、いくつかの培養培地は、酵母細胞抽出物を基本培地に組み込み（例えば、英国特許出願番号第GB 901673号；Keay, L. *Biotechnol. Bioeng.* 17:745-764 (1975) を参照のこと）、窒素および他の必須栄養素の供給源を提供した。他のアプローチにおいて、コムギグルテンの加水分解物を、酵母抽出物の添加を伴うかまたは伴わないで使用してインビトロでの動物細胞増殖を促進した（日本国特許出願第JP2-49579号）。さらに他の培地が開発されており、この培地では血清が肉の酵素消化物か、またはタンパク質（例えば、 α -ラクトアルブミンまたはカゼイン（例えば、ペプトン））で置換されており、これは細菌培養において伝統的に使用されてきている（Lasfargues, E. Y. ら、*In Vitro* 8(6):494-500(1973)；Keay, L., *Biotechnol. Bioeng.* 17:745-764(1975)；Keay, L., *Biotechnol. Bioeng.*

g. 19:399-411 (1977) ; Schlager, E. -J., J. Immunol. Meth. 194:191-199(1996))

。しかし、これらのアプローチのうちで種々の動物細胞の培養に最適な培養培地を提

供したものはない。さらに、特定の植物（コムギ、オオムギ、ライムギ、およびオートムギを含む）からの抽出物は、動物細胞由来の無細胞系におけるタンパク質合成を阻害することが示されている（Coleman, W. H. および Roberts, W. K., Biochim. Biophys. Acta 696:239-244(1982)）。これは、細胞培養培地におけるこれらの植物由来のペプチドの使用が、インビトロでの動物細胞の増殖を刺激するというよりはむしろ実際には阻害し得ることを示唆する。より最近になって、イネペプチドを含む動物細胞培養SFM処方物が記載され、そして種々の正常および形質転換動物細胞の培養に有用であることが示されている（1996年10月10日に出願された同時係属中の、共有に係る米国特許出願第60/028, 197号を参照のこと。この開示は本明細書中でその全体が参考として援用される）。

上皮細胞

概説

上皮は、高等生物の器官および腺の内部表面および外部表面を裏打ちする。環境と生物との間の外部界面（例えば、皮膚）または器官と間質空間との間の内部界面（例えば、腸粘膜裏打ち）におけるこの局在化のため、上皮は、ホメオスタシスの維持に主要な役割を有している。上皮は、例えば、栄養素および排泄物の輸送および透過を調節することによって、この機能を実行する（Freshney, R. I., Culture of Epithelial Cells, Freshney, R. I. 編、New York:Wiley-Liss, 1～23頁(1992)）。

上皮を形成する細胞は、包括的に上皮細胞と呼ばれる。これらの細胞は、皮膚におけるように複数層で、または肺胞におけるように単層で存在し得る。予測され得るように、上皮細胞の構造、機能および生理学は、しばしば、組織特異的である。例えば、皮膚の表皮上皮細胞は、重層扁平上皮として組織化されており、そして主に、生物に対する防御壁を形成することに関与する一方、多くの腺の分泌性上皮細胞は、立方体状細胞の単一層としてしばしば見いだされ、これは、分

泌性タンパク質および糖タンパク質の産生に主要な役割を有している。しかし、それらの位置または機能に拘わらず、上皮細胞は、通常再生性である。つまり、正常な条件下で、または創傷または他の活性化刺激に応答して、上皮細胞は、分

割または増殖することが可能である。この再生能力は、種々の初代上皮細胞および細胞株が首尾良くインビトロで培養されてきている程度にまで上皮細胞のインビトロ操作を容易にしている（Freshney、前出）。

293細胞

種々の上皮細胞および上皮細胞株の単離および使用は、文献において報告されてきている中で、上皮形態を示すヒト胚腎臓細胞株293（「293細胞」）が、特に、外因性リガンドレセプターの発現、ウイルス産生ならびに同種異系間および異種間の組換えタンパク質の発現の研究に有用であることが検証されている。例えば、米国特許第5,166,066号は、ベンゾジアゼピン結合部位（これは、候補向精神薬の同定およびスクリーニングにおいて有用であることが検証されている）を含む機能性GABAレセプターを含む安定な293細胞株の構築を記載する。293細胞はまた、天然アデノウイルスおよび組換えアデノウイルスのようなウイルスを産生するのに使用されてきている（Garnier, A. ら、Cytotechnol. 15:145-155(1994)；Bout, A. ら、Cancer Gene Therapy 3(6):S24, abs. P-52(1996)；Wang, J.-W. ら、Cancer Gene Therapy 3(6):S24, abs. P-53(1996)）。これらは、ワクチン産生または組換えタンパク質発現のためのアデノウイルスベクターの構築のために使用され得る。最後に、293細胞は、種々の組換えヒトタンパク質の大規模産生に有用であることが検証されている（Berg, D. T. ら、Biotechniques 14(6):972-978(1993)；Peshwa, M. V. ら、Biotechnol. Bioeng. 41:179-187(1993)；Garnier, A. ら、Cytotechnol. 15:145-155(1994)）。

線維芽細胞

概説

漠然と線維芽細胞と呼ばれる細胞は、多くの異なる組織から単離されており、そして結合組織細胞であると理解されている。胚組織および成体組織由来の、漠然と線維芽細胞と呼ばれる細胞株を培養することが明らかに可能である。線維芽

細胞は、特徴として「紡錘」の外観を有する。線維芽細胞様細胞は、線維芽細胞に代表的な形態学的特徴を有する。光学顕微鏡下で、細胞は、培養容器の表面上

で単層として増殖する場合、先が尖り、そして長く伸びた様相（紡錘形）を呈する。細胞株は、適切なマーカー（例えば、I型コラーゲン）での確認後、線維芽細胞または線維芽細胞様と見なされ得る（Freshney, R. I. : Culture of Epithelial Cells, Freshney, R. I. 編、New York:Wiley-Liss、1～23頁(1987)）。

CHO細胞

CHO細胞は、チャイニーズハムスター卵巢に由来する上皮細胞かつ線維芽細胞の両方として分類されている。チャイニーズハムスター卵巢から出発した細胞株（CHO-K1）（Kao, F.-T. およびPuck, T. T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:1275-1281(1968)）は、長年培養において使用されているが、その正体は依然として確認されていない。

米国特許第5,316,938号は、CHO細胞を懸濁液中で増殖させるための培地を開示する。この培地は、本質的に、動物供給源から単離されたタンパク質、脂質、および炭水化物を含まない。この特許は、亜鉛が必要に応じた成分であり、そして組換えインスリンを培地に補充することが好ましいことを教示する。

米国特許第5,122,469号は、無タンパク質培地を開示する。この培地は、CHO細胞における組換えタンパク質の発現を容易にする。この特許は、インスリンおよびトランスフェリンの両方を培地に補充することが好ましいことを教示する。

Zang, M. ら、Bio/Technology 13:389-392(1995)は、組換えタンパク質発現のための懸濁培養においてCHO細胞を増殖させるための無タンパク質培地を開示する。米国特許第5,316,938号および同5,122,469号もまた参照のこと。

米国特許第4,767,704号は、無タンパク質培地を開示する。この培地は、抗体産生単層ハイブリドーマ細胞の長期増殖を容易にする。

懸濁細胞

上記のように、ほとんどの初代哺乳動物上皮細胞、哺乳動物線維芽細胞、上皮細胞株、および線維芽細胞株は、代表的に単層培養で増殖される。しかし、いくつかの用途のためには、このような細胞を懸濁培養物として培養することが有利

である。例えば、懸濁培養物は、3次元空間で増殖する。しかし、類似のサイズ

の容器中の単層培養物は、容器表面上で2次元的にしか増殖し得ない。従って、懸濁培養物は、代表的には、単層培養物と比較して、より高い細胞収率を得、そして対応して、生物学的物質（例えば、ウイルス、組換えポリペプチドなど）のより高い収率が得られる。さらに、懸濁培養物はしばしば、給餌および規模拡大がより容易である。これは、単層培養にしばしば要求されるトリプシン処理および遠心分離よりはむしろ、培養容器への新鮮培養培地の単純な添加（希釈継代培養）を介する。

しかし、多くの足場依存性細胞（例えば、初代上皮細胞、初代線維芽細胞、上皮細胞株、および線維芽細胞株）は、懸濁培養には容易には適応しない。これらの細胞は、代表的には、最適な増殖のために基底へのアンカーに依存しているので、これらの細胞の懸濁物における増殖は、ラテックスまたはコラーゲンビーズのような微小キャリアへの付着を必要とし得る。従って、この様式で増殖される細胞は、伝統的な単層培養より高密度な培養が可能であるが、表面に技術的になお付着される；それゆえ、これらの細胞の継代培養は、単層培養について記載される工程と同様の工程を必要とし得る。さらに、大バッチ培養または発酵槽培養が確立される場合、培養容器の底にしばしば大量の微小キャリアが沈降し、そのため、細胞に剪断損傷を起こすことなく、微小キャリア（従って、細胞）を懸濁物として維持するためにより複雑な攪拌機構を必要とする（Peshwa, M. V. ら、Bio technol. Bioeng. 41:179-187(1993)）。

多くの形質転換された細胞が懸濁物中で増殖可能である（Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, New York: Alan R. Liss, Inc. 123~125頁(1983)）が、首尾良い懸濁培養は、しばしば、比較的高タンパク質の培地または血清または血清成分（例えば、接着因子であるフィブロネクチンおよび／またはビトロネクチン）の培地への補充、あるいは洗練された灌流培養制御系（Kyung, Y. -S. ら、Cytotechnol. 14:183-190(1994)）（これは、上記の理由で不利であり得る）を必要とする。さらに、多くの上皮細胞は、懸濁液中で増殖する場合、凝集体（aggregate）すなわち「凝集体（clump）」を形成する

。この凝集体は、首尾良い継代培養に干渉し、そして増殖速度および培養物による生物学的物質の産生を低減させる。凝集が起こる場合、培地に曝露される全

体の細胞表面積が減少し、そして細胞は、栄養素から枯渇させられる。結果として、増殖が遅延し、細胞密度の低減が得られ、そしてタンパク質発現が損なわれる。

従って、高密度への哺乳動物細胞の増殖を容易にし、そして／または組換えタンパク質の発現のレベルを増大させ、細胞凝集を低減させ、そして動物タンパク質（例えば、トランスフェリンおよびインスリン）の補充を必要としない、化学的に規定され、無タンパク質の培地に対する必要性が依然として存在する。

また、通常アンカー依存性である哺乳動物細胞（上皮細胞および線維芽細胞（例えば、293細胞およびCHO細胞）を含む）の懸濁培養のための、無血清かつ低タンパク質または無タンパク質である規定された培養培地に対する必要性も依然として存在する。このような培養培地は、増殖因子および他の刺激の細胞生理学への影響の研究を容易にし、バイオテクノロジー産業において培養哺乳動物細胞により産生される、生物学的物質（例えば、ウイルス、組換えタンパク質など）のより簡単でかつより対費用効果のある産生および精製を可能にし、そして哺乳動物細胞の培養を使用する方法においてより一貫した結果を提供する。

発明の要旨

本発明は、哺乳動物細胞をインビトロで懸濁液中で培養する方法を提供し、この方法は、(a)懸濁液中で培養されるべき哺乳動物細胞を得る工程；および(b)該細胞を、少なくとも1つのポリアニオン性またはポリカチオン性化合物を含む無血清細胞培養培地と接触させる工程を包含し、ここで該培地が、懸濁液中における該細胞の培養を支持する、方法である。本発明はまた、懸濁培養のための培地およびこのような懸濁培養物における哺乳動物細胞を含む組成物に関する。

本発明はまた、哺乳動物細胞培養培地においてタンパク質（特に動物由来タンパク質）を交換する方法に関する。特に、本発明は、トランスフェリンおよび／またはインスリンの交換、このような交換物を含む培地、およびこのような培地において哺乳動物細胞を含む組成物に関連する。

本発明は、特に、本明細書中で「懸濁培地」と称される培地および本明細書中で「交換培地」と称される培地に関連する。

懸濁培地

本発明は、1つ以上のポリアニオン性またはポリカチオン性化合物を含む無血清細胞培養培地に関し、ここでこの培地は、インビトロでの哺乳動物上皮または線維芽細胞の懸濁培養を支持し得る。懸濁培地では、ポリアニオン性化合物が、好ましくは、ポリスルホン化またはポリ硫酸化化合物であり、より好ましくは、ヘパリン、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ペントサンポリ硫酸、プロテオグリカンなど、そして最も好ましくは、デキストラン硫酸（好ましくは約5,000ダルトンの分子量を有する）である。

特に、本発明は、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上の無機塩、1つ以上の糖、1つ以上の緩衝化塩、1つ以上の脂質、1つ以上のインスリン（またはインスリン置換物）、および1つ以上のトランスフェリン（またはトランスフェリン置換物）からなる群の成分から選択される1つ以上の成分をさらに含む、このような培養培地に関する。本培地において用いられる好ましい糖はD-グルコースであり、一方、好ましい緩衝化塩は、N-[2-ヒドロキシエチル]-ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸] (HEPES)である。本発明はまた、必要に応じて、1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチド、および1つ以上の植物ペプチド（好ましくは、1つ以上のイネペプチドまたはダイズペプチドである）からなる群の補充物から選択される1つ以上の補充物を含み得るような培養培地に関する。本培地のアミノ酸成分は、好ましくは、以下からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸を含む：L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、およびL-バリン。本培地のビタミン成分は、好ましくは以下からなる群から選択される1つ以上のビタミンを含む：ビオチン、塩化コリン、D-Ca⁺⁺-パントテン酸、葉酸、i-イノシトール、ナイア

シンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、およびビタミンB₁₂。本培地の無機塩成分は、好ましくは、以下からなる群から選択される1つ以上の

無機塩を含む：1つ以上のカルシウム塩、Fe(NO₃)₃、KCl、1つ以上のマグネシウム塩、1つ以上のマンガン塩、NaCl、NaHCO₃、Na₂HP0₄、1つ以上のセレンウム塩、1つ以上のバナジウム塩、および1つ以上の亜鉛塩。

本発明はまた、以下の成分を含む細胞培養培地に関し、ここで各成分は、インビトロでの哺乳動物上皮細胞の懸濁培養を支持する量で存在する：エタノールアミン、D-グルコース、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸](HEPES)、インスリン、リノール酸、リボ酸、フェノールレッド、プルロニックF68、プトレッシン、ピルビン酸ナトリウム、トランスフェリン、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、ビオチン、塩化コリン、D-Ca⁺⁺-パントテン酸、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、ビタミンB₁₂、1つ以上のカルシウム塩、Fe(NO₃)₃、KCl、1つ以上のマグネシウム塩、1つ以上のマンガン塩、NaCl、NaHCO₃、Na₂HP0₄、1つ以上のセレンウム塩、1つ以上のバナジウム塩、および1つ以上の亜鉛塩。本発明はまた、さらにデキストラン硫酸を含み、そして必要に応じて、1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチド、および1つ以上の植物ペプチド（最も好ましくは1つ以上のイネペプチドまたは1つ以上のダイズペプチド）からなる群から選択される、1つ以上の補充物を含む、このような培地に関する。

本発明はまた、基本培地をデキストラン硫酸（好ましくは、約5,000ダルトンの分子量を有する）と組み合わせることにより得られる哺乳動物細胞培養培地に関する。ここで、この培地は、インビトロでの哺乳動物上皮または線維芽細胞の懸濁培養を支持し得る。1つの好ましいこのような培地では、基本培地は、以下からなる群から選択される1つ以上の成分を組み合わせることにより得られ、こ

ここで、各成分は、インビトロでの哺乳動物上皮または線維芽細胞の懸濁培養を支持する量で添加される：エタノールアミン、D-グルコース、N-[2-ヒドロキシエチル]-ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸](HEPES)、インスリン、リノール酸

、
 リボ酸、フェノールレッド、プルロニックF68、プトレッシン、ピルビン酸ナトリウム、トランスフェリン、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、ビオチン、塩化コリン、D-Ca⁺⁺ f-パントテン酸、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、ビタミンB₁₂、1つ以上のカルシウム塩、Fe(NO₃)₃、KCl、1つ以上のマグネシウム塩、1つ以上のマンガン塩、NaCl、NaHCO₃、Na₂HPO₄、1つ以上のセレンウム塩、1つ以上のバナジウム塩、および1つ以上の亜鉛塩。本発明はまた、上記のように得られる培地と、以下からなる群から選択される1つ以上の補充物とを組み合わせることにより得られる培地に関する：1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチド、および1つ以上の植物ペプチド（好ましくは、1つ以上のイネペプチドまたは1つ以上のダイズペプチド）。

本発明により提供される培地は、タンパク質非含有であり得、そして1×処方物であり得るかまたは10×以上の処方物に濃縮され得る。本発明の基本培地は、アミノ酸、ビタミン、有機塩および無機塩、糖および他の成分を含む多数の成分を含み、各成分は、インビトロでの哺乳動物上皮細胞の培養を支持する量で存在する。培地は、種々の哺乳動物細胞を培養するために用いられ得、以下を含む：初代上皮細胞（例えば、ケラチノサイト、頸上皮細胞、気管支上皮細胞、気管上皮細胞、腎上皮細胞、および網膜上皮細胞）および樹立細胞株（例えば、293胚腎細胞、HeLa頸上皮細胞およびPER-C6網膜細胞、MDBK (NBL-1) 細胞、CRFK細胞、MDCK細胞、CHO細胞、BeWo細胞、Chang細胞、Detroit 562細胞、HeLa 229細胞、HeLa S3細胞、Hep-2細胞、KB細胞、LS 180細胞、LS 174T細胞、NCI-H-548細胞

、RPMI 2650細胞、SW-13細胞、T24細胞、WI-28 VA13、2RA細胞、WISH細胞、BS-C-I細胞、LLC-MK₂細胞、クローンM-3細胞、I-10細胞、RAG細胞、TCMK-1細胞、Y-1細胞、LLC-PK₁細胞、PK(15)細胞、GH₁細胞、GH₃細胞、L2細胞、LLC-RC256細胞、MH₁C₁細胞、XC細胞、MDOK細胞、VSW細胞、およびTH-I B1細胞またはそれらの誘導体)、任意の組織または器官由来の線維芽細胞(組織または器官は、以下を含む

が、これらに限定されない：心臓、肝臓、腎臓、結腸、腸(intestine)、食道、胃、神経組織(脳、脊髄)、肺、血管組織、(動脈、静脈、毛管)、リンパ組織(リンパ腺、腺様、扁桃腺、骨髄、および血液)、脾臓)、ならびに線維芽および線維芽様細胞株(例えば、CHO細胞、TRG-2細胞、IMR-33細胞、Don細胞、GHK-21細胞、シトルリン血細胞、Dempsey細胞、Detroit 551細胞、Detroit 510細胞、Detroit 525細胞、Detroit 529細胞、Detroit 532細胞、Detroit 539細胞、Detroit 548細胞、Detroit 573細胞、HEL 299細胞、IMR-90細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、WI-26細胞、MiCl₁細胞、CHO細胞、CV-1細胞、COS-1細胞、COS-3細胞、COS-7細胞、Vero細胞、DBS-FrhL-2細胞、BALB/3T3細胞、F9細胞、SV-T2細胞、M-MSV-BALB/3T3細胞、K-BALB細胞、BL0-11細胞、NOR-10細胞、C₃H/IOTI/2細胞、HSDM₁C₃細胞、KLN205細胞、McCoy細胞、Mouse L細胞、Strain 2071(Mouse L)細胞、L-M strain(Mouse L)細胞、L-MTK(Mouse L)細胞、NCTCクローン2472および2555、SCC-PSA1細胞、Swiss/3T3細胞、Indian muntjac細胞、SIRC細胞、C₁₁細胞、およびJensen細胞、あるいはそれらの誘導体)。

本発明の培地により支持される細胞は、任意の動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトに由来し得る。本培地において培養される細胞は、正常細胞または異常細胞(すなわち、形質転換細胞、樹立細胞、または疾患組織サンプル由来の細胞)であり得る。本発明の培地はまた、異なる形態で調製され得る：例えば、乾燥粉末培地(「DPM」)、液体培地、または培地濃縮物。

本発明はまた、本明細書中で開示の培養培地処方物を用いる哺乳動物上皮または線維芽細胞の培養方法を提供する。この方法は、(a)細胞を、本発明の細胞培養培地と接触させる工程；および(b)細胞を、細胞の培養を支持するのに適

切な条件下で培養する工程を含む。好ましくは、これらの方法に従って培養される細胞（上述の細胞のいずれかを含み得る）は、懸濁液中で培養される。

本発明はまた、哺乳動物上皮細胞の培養において用いるためのキットを提供する。本発明のキットは、1つ以上の容器を含み、ここで第一の容器は、本発明の培養培地を含む。本発明のさらなるキットは、1つ以上の容器を含み、ここで、第一の容器は、上記のような基本培養培地を含み、そして第二の容器は、1つ以上のポリアニオン性またはポリカチオン性化合物、好ましくは、ポリスルホン化

またはポリ硫酸化化合物、より好ましくは、ヘパリン、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ペントサンポリ硫酸、プロテオグリカンなど、そして最も好ましくは、デキストラン硫酸（好ましくは、約5,000ダルトンの分子量を有する）を含む。これらのキットは、1つ以上のさらなる容器（1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチド、ならびに1つ以上の植物ペプチド（好ましくは、1つ以上のイネペプチドまたは1つ以上のダイズペプチド）からなる群から選択される1つ以上の補充物を含む）をさらに含み得る。

本発明は、本発明の培養培地を含む組成物をさらに提供する。これは、必要に応じて、1つ以上の哺乳動物上皮または線維芽細胞（例えば、上述の細胞、特に、1つ以上の293胚腎細胞、PER-C6網膜細胞、およびCHO細胞）をさらに含み得る。

本発明は、さらに、懸濁液中で哺乳動物細胞（特に、上記の細胞、そして最も特定すると、293胚腎上皮細胞、PER-C6、およびCHO細胞）を培養する方法に関し、この方法は、(a) 懸濁液中で培養されるべき哺乳動物細胞を得る工程；および (b) 細胞を、懸濁液中での細胞の培養を支持するのに十分な条件下で、本発明の培養培地と接触させる工程を包含する。

本発明はさらに、ウイルスを生産する方法、およびこれらの方法により生産されたウイルスに関する。この方法は、(a) ウイルスで感染されるべき哺乳動物細胞、好ましくは、上述の哺乳動物細胞、そして最も好ましくは293胚腎上皮細胞、PER-C6、およびCHO細胞を得る工程；(b) 細胞を、ウイルスによる細胞の感

染を促進するのに適切な条件下でウイルスと接触させる工程；および(c)細胞によるウイルスの生産を促進するのに適切な条件下で、本発明の培養培地中で細胞を培養する工程を包含する。これらの方法に従って生産され得るウイルスは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびレトロウイルスを包含する。

本発明はさらに、ポリペプチドを生産する方法、およびこれらの方法により生産されるポリペプチドに関する。この方法は、(a)ポリペプチドを生産するように遺伝子操作された哺乳動物細胞、好ましくは、上述の哺乳動物細胞、そして最も好ましくは293胚腎上皮細胞、PER-C6、およびCHO細胞を得る工程；および(b)哺乳動物細胞によって所望されるポリペプチドの発現を好む条件下で、哺乳

動物細胞を本発明の培養培地中で培養する工程を包含する。

交換培地

本発明はまた、化学的に規定された、無タンパク質の真核生物（例えば、哺乳動物）細胞培養培地（これは、 Fe^{2+} および／もしくは Fe^{3+} キレートならびに／または Zn^{2+} 塩、ならびに必要に応じて少なくとも1つの本明細書中で規定されるポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含む）交換培地を提供する。これは、懸濁培養における増殖（詳細には、任意の言及された哺乳動物細胞、特に上記の哺乳動物細胞、好ましくはCHO細胞、PER-C6細胞、および293細胞の高密度増殖）を支持し得、培養された細胞中の組換えタンパク質の発現のレベルを増大し得、そして／または培養された細胞中のウイルス産生を増大し得る。さらに、本発明は、鉄キレートと亜鉛を組み合わせることによって得られる、真核生物細胞培養培地を提供する。これは、懸濁培養におけるその密度の増殖（詳細には、言及された哺乳動物細胞のいずれか、特に上記の哺乳動物細胞、好ましくはCHO細胞、PER-C6細胞、および293細胞の高密度増殖）を支持し得、培養された細胞中の組換えタンパク質の発現レベルを増大し得、そして／または培養された細胞中のウイルス産生を増大し得る。さらに、本発明は、その細胞が組換えタンパク質を発現するように懸濁培養において哺乳動物細胞（詳細には、CHO細胞）を培養する方法を提供する。この方法は、その細胞を細胞真核生物培養培地（ここで、鉄キレートおよび亜鉛が培養における哺乳動物細胞の増殖を支持する量で、そ

して必要に応じて、ポリアニオン性化合物またはポリアニオン性化合物が、それらの化合物が添加されない場合と比較して細胞の凝集を減少させるに有効な量で共に存在する）と接触させる工程、およびその細胞を、培養された細胞における組換えタンパク質の発現のレベルを増大させる懸濁培養における増殖（詳細には、言及された哺乳動物細胞のいずれか、特に上記の哺乳動物細胞、好ましくはCHO細胞、PER-C6細胞、および293細胞の高密度増殖）、および／または培養された細胞におけるウイルス産生の増大の両方を支持するに適切な条件下で培養する工程を包含する。

本発明によって提供される培地は、無タンパク質であり得、そして1×処方物であり得るか、または10×以上の処方物として濃縮され得る。本発明の基本培地は、多くの成分を含む。これは、アミノ酸、ビタミン、有機塩および無機塩、糖ならびに他の成分を含む。各成分は、インビトロで哺乳動物の上皮細胞の培養を支持する量で存在する。培地は種々の哺乳動物細胞を培養するために使用され得る。これには、初代上皮細胞（例えば、ケラチノサイト、子宮頸部上皮細胞、気管支上皮細胞、気管上皮細胞、腎臓上皮細胞、および網膜上皮細胞）ならびに樹立細胞株（例えば、293胚腎臓細胞、HeLa子宮頸部上皮細胞、およびPER-C6網膜細胞、MDBK (NBL-1) 細胞、CRFK細胞、MDCK細胞、CHO細胞、BeWo細胞、Chang細胞、Detroit562細胞、HeLa229細胞、HeLaS3細胞、Hep-2細胞、KB細胞、LS180細胞、LS174T細胞、NCI-H-548細胞、RPMI2650細胞、SW-13細胞、T24細胞、WI-28VA 13, 2RA細胞、WISH細胞、BS-C-1細胞、LLC-MK₂細胞、Clone M-3細胞、I-10細胞、RAG細胞、TCMK-1細胞、Y-1細胞、LLC-PK₁細胞、PK(15)細胞、GH₁細胞、GH₃細胞、L2細胞、LLC-RC 256細胞、MH₁C₁細胞、XC細胞、MDOK細胞、VSW細胞、およびTH-I, B1細胞、またはそれらの派生物）、任意の組織または器官（これには、心臓、肝臓、腎臓、結腸、腸、食道、胃、神経組織（脳、脊髄）、肺、血管組織（動脈、静脈、毛細血管）、リンパ組織（リンパ節、アデノイド、扁桃腺、骨髄、および血液）、脾臓が挙げられるが、これらに限定されない）由来の線維芽細胞、ならびに線維芽細胞株および線維芽細胞様細胞株（例えば、CHO細胞、TRG-2細胞、IMR-33細胞、Don細胞、GHK-21細胞、シトルリン血症細胞、Dempsey細胞、De

troit551細胞、Detroit510細胞、Detroit525細胞、Detroit529細胞、Detroit532細胞、Detroit539細胞、Detroit548細胞、Detroit573細胞、HEL299細胞、IMR-90細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、WI-26細胞、MiCl₁細胞、CHO細胞、CV-1細胞、COS-1細胞、COS-3細胞、COS-7細胞、Vero細胞、DBS-FrhL-2細胞、BALB/3T3細胞、F9細胞、SV-T2細胞、M-MSV-BALB/3T3細胞、K-BALB細胞、BLO-11細胞、NOR-10細胞、C₃H/10T1/2細胞、HSDM₁C₃細胞、KLN205細胞、McCoy細胞、マウスL細胞、Strain 2071（マウスL）細胞、L-M株（マウスL）細胞、L-MTK（マウスL）細胞、NC TCクローン2472および2555、SCC-PSA1細胞、Swiss/3T3細胞、Indian muntjac細胞、SIRC細胞、C₁₁細胞、ならびにJensen細胞、またはそれらの派生物）が挙げられる。

本発明の培地によって支持される細胞は、任意の動物、好ましくは哺乳動物、

最も好ましくはヒトに由来し得る。本培地において培養される細胞は、正常な細胞または異常な細胞（すなわち、形質転換細胞、樹立細胞、または疾患組織サンプル由来の細胞）であり得る。本発明の培地はまた、異なる形態（例えば、乾燥粉末培地（「DPM」）、液体培地、または培地濃縮物）で調製され得る。

本発明はまた、本明細書中で開示される培養培地処方物を使用して哺乳動物上皮細胞または哺乳動物線維芽細胞を培養する方法を提供する。この方法は、（a）細胞を本発明の細胞培養培地と接触させる工程；および（b）細胞の培養を支持するに適切な条件下で細胞を培養する工程を包含する。好ましくは、これらの方法によって培養される細胞（これは、上記の細胞のいずれかを含み得る）は、懸濁物において培養される。

本発明の培地は、植物起源および動物起源のいずれのタンパク質または加水分解物も含まない化学的に規定された処方物である。本発明は任意の特定の理論に束縛されないが、哺乳動物細胞の増殖を促進する本発明の培地の能力は、亜鉛によるインスリンの置換および／または鉄キレートによるトランスフェリンの置換に起因すると考えられる。さらに、デキストラン硫酸を補充した場合、培地は、培養された細胞において、組換えタンパク質の発現レベルを増大させる懸濁培養において増殖（詳細には、言及された哺乳動物細胞のいずれか、特に上記の哺乳

動物細胞、好ましくはCHO細胞、PER-C6細胞、および293細胞の高密度増殖)を促進し、そして／または凝集を伴わずに培養された細胞におけるウイルス産生を増大させる。

本発明の培地は、高密度まで(詳細には、言及された哺乳動物細胞のいずれか、詳細には上記の細胞、好ましくはCHO細胞、PER-C6細胞、および293細胞の高密度まで)哺乳動物細胞を増殖し、このような細胞における組換えタンパク質の発現を促進し、そして／または凝集を伴うことなく培養された細胞におけるウイルス産生を増大させるために使用され得る。この培地は都合が良い。なぜならば、それは化学的に規定され、それは無タンパク質であり、そして細胞増殖および／または組換えタンパク質の発現を促進するためにトランスフェリン、インスリン、または他の成分の補充を必要としないからである。さらに、本発明の培地の無タンパク質性質は、組換えタンパク質の精製を非常に簡単にする。

本発明はまた、哺乳動物細胞の上皮細胞の培養における使用のためのキットを提供する。本発明に従うキットは1つ以上の容器を含み、ここで第1の容器は本発明の培養培地を含む。本発明のさらなるキットは1つ以上の容器を含み、ここで第1の容器が上記の基礎培養培地を含み、そして第2の容器が1つ以上のポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物、好ましくはポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物、より好ましくはヘパリン、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ペントサンポリ硫酸、プロテオグリカンなど、および最も好ましくはデキストラン硫酸(好ましくは約5,000ダルトンの分子量を有する)を含む。

本発明の他の好ましい実施態様は、以下の図面および発明の説明、ならびに請求の範囲を考慮して当業者に明らかである。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の懸濁培養培地中で懸濁物において培養された293細胞の細胞増殖(■)および生存細胞パーセント(●)を、5日の時間経過に渡って示す線グラフを示す。

図2は、トランスフェリンを含まない懸濁培養培地中で(●)、ヒトトランス

フェリンを含む本培養培地中で(■)、またはトランスフェリンを60 μ M塩化第二鉄／クエン酸ナトリウムキレート(▲)もしくは40 μ M硫酸第一鉄／EDTAキレート(▽)で置換した本培養培地中で懸濁物において培養した293細胞の7日の時間経過に渡る生存細胞濃度を示す線グラフを示す。

図3は、5日の時間経過に渡る、本発明の懸濁培養培地中で培養した293細胞におけるアデノウイルス5型の産生を示す棒グラフを示す。TICD50=組織培養感染用量-50%

図4は、本発明の懸濁培養培地中で培養した293細胞による、6日の時間経過に渡る生存細胞数の関数として β -ガラクトシダーゼ産生を示す線グラフを示す。

図5Aは、r β -gal CHO細胞の増殖に対する低タンパク質／無血清培地、本質的に無タンパク質である培地、および無タンパク質／化学的に規定された培地の効果を示す棒グラフを示す。図5Bは、r β -gal CHO細胞におけるr β -ガラクトシダ

ーゼの発現に対する低タンパク質／無血清培地、本質的に無タンパク質な培地、および無タンパク質／化学的に規定された培地の効果を示す棒グラフを示す。

図6Aは、r β -gal CHO細胞の増殖に対する低タンパク質／無血清培地、本質的に無タンパク質である培地、および無タンパク質／化学的に規定された培地の効果を示す棒グラフを示す。この図において「g」は、増殖期をいい、そして「p」は産生期をいう。図6Bは、r β -gal CHO細胞におけるr β -ガラクトシダーゼの発現に対する低タンパク質／無血清培地、本質的に無タンパク質である培地、および無タンパク質／化学的に規定された培地の効果を示す棒グラフを示す。この図において「g」は、増殖期をいい、そして「p」は産生期をいう。

図7Aは、r β -gal CHO細胞の増殖に対するメトトレキサートの効果を示す棒グラフを示す。図7Bは、r β -gal CHO細胞におけるr β -ガラクトシダーゼの発現に対するメトトレキサートの効果を示す棒グラフを示す。

図8Aは、rbGH CHO細胞に対する本質的に無タンパク質である培地(●)および無タンパク質／化学的に規定された培地(■)の効果を示すグラフを示す。図8Bは、rbGH CHO細胞におけるrbGHの発現に対する本質的に無タンパク質である培地

(●) および無タンパク質／化学的に規定された培地 (■) の効果を示すグラフを示す。

図9Aは、 $r\beta$ -gal CHO細胞の増殖に対する低タンパク質、インスリンおよびトランスフェリン含有培地、ならびに無タンパク質／化学的に規定された培地の効果を示す棒グラフを示す。図9Bは、 $r\beta$ -gal CHO細胞における $r\beta$ -ガラクトシダーゼの発現に対する低タンパク質、インスリンおよびトランスフェリン含有培地ならびに無タンパク質／化学的に規定された培地の効果を示す棒グラフを示す。

図10は、 $r\beta$ -gal CHO細胞の増殖に対するCD CHO培地、CHO III培地、およびFMX-8培地の効果を示す棒グラフを示す。

図11は、 $r\beta$ -gal CHO細胞における $r\beta$ -ガラクトシダーゼの発現に対するCD CHO培地、CHO III培地、およびFMX-8培地の効果を示す棒グラフを示す。

図12Aは、振盪フラスコ (■) およびバイオリアクター (●) においてCD CHO培地中で培養した $r\beta$ -gal CHO細胞の増殖のレベルを示す。図12Bは、振盪フラスコおよびバイオリアクターにおいてCD CHO培地中で培養した細胞の $r\beta$ -gal発現のレベルを示す。

図13は、 $r\beta$ -gal CHO細胞の増殖に対するデキストラン硫酸の効果を示す棒グラフを示す。図において、「A」はデキストラン硫酸 (m.w. 5,000) であり、そして「C」はデキストラン硫酸 (m.w. 500,000) である。

図14は、 $r\beta$ -gal CHO細胞における $r\beta$ -ガラクトシダーゼの発現に対するデキストラン硫酸の効果を示す棒グラフを示す。図において、「A」は、デキストラン硫酸 (m.w. 5,000) であり、そして「C」はデキストラン硫酸 (m.w. 500,000) である。

発明の詳細な説明

定義

続く説明において、細胞培養培地の分野において慣習的に使用される多くの用語は、広範に利用される。本明細書および請求の範囲、ならびにそのような用語を与えられるべき範囲の明白かつ一貫した理解を提供するために、以下の定義が提供される。

用語「バッチ培養物」は、培養された細胞に新しい培地を再び与えることなしに、播種から結末まで進行させた培養物をいう。

用語「サイトカイン」は、細胞における生理学的応答（例えば、増殖、分化、老化、アポトーシス、細胞傷害性、または抗体分泌）を誘導する化合物をいう。増殖因子、インターロイキン、コロニー刺激因子、インターフェロン、リンホカインなどが、「サイトカイン」のこの定義に含まれる。

「細胞培養」または「培養」によって、人工的なインビトロ環境における細胞の維持が意味される。しかし、用語「細胞培養」は一般的な用語であり、そして個々の細胞だけではなく、組織、器官、器官系、または全生物体の培養を含むように使用され得、そのため用語「組織培養」、「器官培養」、「器官系培養」、または「器官型培養」が、時に用語「細胞培養」と交換可能に使用され得ることは、理解されるべきである。本発明の培地は、任意の付着哺乳動物細胞（すなわち、培養容器に付着する細胞）、および懸濁培養において増殖する任意の哺乳動物細胞を培養するために使用され得る。

「培養」によって、細胞の活性状態または静止状態において増殖、分化、または連続的な生存能力を助ける条件下でのインビトロにおける細胞の維持が意味される。この意味において、「培養」は、「細胞培養」または上記の任意のその同義語と交換可能に使用され得る。

「培養容器」によって、細胞を培養するための無菌環境を提供し得るガラス容器、プラスチック容器、または金属容器が意味される。

句「細胞培養培地」、「培養培地」（各場合において複数形の「培地」）、および「培地処方物」は、細胞を培養するための栄養溶液をいい、そして交換可能に使用され得る。

用語「接触」は、培養容器中においてインビトロで培養されるべき細胞を、細胞が培養されるべき培地とともに置くことをいう。用語「接触」は、細胞を培地と混合する工程、培地を培養容器中の細胞上にピペッティングする工程、および細胞を培養培地中に浸す工程を包含する。

用語「組み合わせ」は、細胞培養培地処方物中の成分を混合または混和する工

程をいう。

「化学的に定義された」培地は、すべての成分が知られている培地である。化学的に定義された培地は、血清、胚抽出物、および加水分解産物（これらのそれぞれが未知の成分を含む）と区別される。本発明の培地は化学的に定義され、タンパク質およびペプチドを含まない。

用語「高密度」は、約 1×10^6 ～約 2×10^7 細胞/mlの細胞密度をいう。好ましい実施態様において、この用語は、バッチ培養物中約 1×10^6 ～約 5×10^6 細胞/mlの細胞密度をいう。

用語「成分」は、化学的起源の成分であれ生物学的起源の成分であれ、細胞の増殖の増加を維持または促進するために細胞培養培地において使用され得る任意の化合物をいう。用語「成分」、「栄養素」、および「成分」は交換可能に使用され得、そしてすべてがそのような化合物をいうことが意味される。細胞培養培地において使用される代表的な成分は、アミノ酸、塩、金属、糖、脂質、核酸、ホルモン、ビタミン、脂肪酸、タンパク質などを含む。エキソビボでの細胞の培養を促進または維持する他の成分は、特定の必要性に従って当業者によって選択され得る。

細胞培養培地において使用される各成分は、固有の物理的および化学的特徴を有する。「適合性成分」によって、溶液において維持され、そして「安定な」配合を形成し得るそれらの培地栄養素が意味される。「適合性成分」を含む溶液は、成分が毒性化合物へと実質的に分解または分解(decompose)しないか、あるいは細胞培養物によって利用もしくは異化され得ない化合物へと実質的に分解または分解しない場合、「安定」であると言われる。成分はまた、分解が検出され得ない場合、または $1 \times$ 細胞培養培地処方物中の同じ成分の分解と比較した場合に分解がより遅い速度で起こる場合「安定」と考えられる。例えば、 $1 \times$ 培地処方物中のグルタミンは、カルボン酸ピロリドンおよびアンモニアへと分解することが知られている。二価のカチオンと組み合わせたグルタミンは、分解が経時的にほとんどまたは全く検出され得ないため、「適合性成分」と考えられる。米国特許第5,474,931号を参照のこと。

安定性測定に加えて、培地成分の適合性もまた、溶液中の成分の「溶解性」によって決定される。用語「溶解性」または「可溶性」は、他の成分を有する溶液を形成する成分の能力をいう。従って、成分が測定可能または検出可能な沈殿物を形成することなしに溶液中で維持され得る場合、成分は適合性である。従って、本明細書中で使用される用語「適合性成分」は、濃縮または1×処方物のいずれかとして溶液において混合される場合、「安定」および「可溶性」である特定の培養培地成分の組み合わせをいう。

「無タンパク質」培地は、タンパク質もペプチドも含まない培地である。無タンパク質培地は、低タンパク質および本質的にタンパク質を含まない培地（この両方は、タンパク質および／またはペプチドを含む）と区別される。

細胞培養培地は多くの成分から構成され、そしてこれらの成分は培養培地毎に変化する。「1×処方物」は、作用濃度にて細胞培養培地中に見出されるいくつかまたはすべての成分を含む任意の水溶液をいうと意味される。例えば、「1×処方物」は、細胞培養培地、またはその培地のための任意のサブグループの成分をいい得る。1×溶液中の成分の濃度は、インビトロで細胞を維持または培養するために使用される細胞培養処方物において見出されるその成分の濃度とほぼ同

じである。細胞のインビトロ培養のために使用される細胞培養培地は、定義によって1×処方物である。多くの成分が存在する場合、1×処方物中の各成分は、細胞培養培地中のそれらの成分の濃度にほぼ等しい濃度を有する。例えば、RPMI-1640培養培地は、他の成分中、0.2g/LのL-アルギニン、0.05g/LのL-アスパラギン、および0.02g/LのL-アスパラギン酸を含む。これらのアミノ酸の「1×処方物」は、溶液中のこれらの成分とほぼ同じ濃度を含む。従って、「1×処方物」をいう場合、溶液中の各成分が記載される細胞培養培地において見出される濃度と同じか、またはほぼ同じ濃度を有することが意図される。細胞培養培地の1×処方物中の成分の濃度は当業者に周知である。Methods For Preparation of Media, Supplements and Substrate For Serum-Free Animal Cell Culture, New York: Allen R. Liss(1984)を参照のこと（これは、その全体が本明細書中で参考として援用される）。しかし、浸透圧および／またはpHは、特により少ない成分が

1×処方物中に含まれる場合、培養培地と比較した1×処方物において異なり得る。

「10×処方物」は、その溶液中の各成分が、細胞培養培地中の同じ成分より約10倍濃縮されている溶液に言及することが意味される。例えば、10×処方物のRPMI-1640培養培地は、他の成分の中でも、2.0g/LのL-アルギニン、0.5g/LのL-アスパラギン、および0.2g/LのL-アスパラギン酸を含み得る（上記の1×処方物を比較すること）。「10×処方物」は、1×培養培地において見出される濃度の約10倍の濃度にて、多くのさらなる成分を含み得る。容易に明白であるように、「25×処方物」、「50×処方物」、「100×処方物」、「500×処方物」、および「1000×処方物」は、1×細胞培養培地と比較した場合、それぞれ約25倍、50倍、100倍、500倍、または1000倍の濃度で成分を含む溶液を命名する。さらにまた、培地処方物および濃縮溶液の浸透圧およびpHは、変化し得る。

同様に、動物由来か、または当該分野において日常的な方法を用いてインビトロもしくはインビボで構築される組織、器官、および器官系は、本発明の培養培地中で培養され得る。細胞が生じ得る動物は、ヒト、サル、類人猿、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ウシ、ブタ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、およびヒツジを含み得る。

本発明の培地は、バイオリアクター、回転瓶、およびマイクロキャリアシステム中の懸濁培養物において哺乳動物細胞を増殖するために使用され得る。

懸濁培養培地の処方

本発明の懸濁培地は、一般に1つ以上のポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物を含む無血清細胞培養培地に関し、ここで培地は、インビトロでの哺乳動物上皮細胞（上皮細胞または線維芽細胞）の懸濁培養を支持し得る。本培地において、ポリアニオン性化合物は、好ましくはポリスルホン化またはポリ硫酸化化合物、より好ましくはヘパリン、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ペントサンポリ硫酸、プロテオグリカンなど、そして最も好ましくはデキストラン硫酸（これは、好ましくは、約5,000ダルトンの分子量を有する）である。本発明はまた、一般に、哺乳動物細胞の懸濁培

養における使用のための無血清培養培地に関し、それは1つ以上の上記のポリアニオン性またはポリカチオン性化合物（特に、デキストラン硫酸）を含む。さらに、本発明は、ウイルスの産生における使用のための無血清培養培地に関し、この培地は、1つ以上の上記のポリアニオン性またはポリカチオン性化合物（特に、デキストラン硫酸）を含み、ここで培地中で懸濁して培養されるウイルス感染哺乳動物細胞は、培地中で懸濁して培養されない哺乳動物細胞より高いウイルス力価を生成する。

基本培地および完全培地

任意の基本培地は、本発明に従って使用され得る。本発明の基本培地が含む成分は、アミノ酸、ビタミン、無機塩、糖、緩衝化塩、脂質、インスリン（またはインスリン置換体）、およびトランスフェリン（またはトランスフェリン置換体）である。より詳細には、基本培地は、エタノールアミン、D-グルコース、N-[2-ヒドロキシエチル]-ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸] (HEPES)、インスリン、リノレン酸、リボ酸、フェノールレッド、PLURONIC[®] 68、プトレシン、ピルビン酸ナトリウムを含み得る。この培養培地は血清を含まない。従って、SF Mと考えられる：それはまた、唯一のタンパク質成分がインスリンおよびトラン

スフェリンであるため、低タンパク質培地である。トランスフェリンは、無鉄形態（すなわち、アポトランスフェリン）または鉄錯体形態（すなわち、フェロトランスフェリンまたはホロトランスフェリン）であり得、そしてもし存在するならば、インスリンは、ヒト由来または動物由来であり得、そして天然または組換えであり得る。当然のことながら、培地は、処方物中にトランスフェリンおよびインスリンを含まないことによって、完全に無タンパク質に作成され得る。トランスフェリンは、約10~100 μ Mの濃度でのクエン酸第二鉄キレート（好ましくは、約60 μ Mでの FeCl_3 -クエン酸ナトリウムキレート）または約10~100 μ Mの濃度での硫酸第一鉄キレート（好ましくは、約40 μ Mでの FeSO_4 -EDTAキレート）によって置換され得る。インスリンは、1つ以上の亜鉛含有化合物（例えば、1つ以上の亜鉛塩）によって置換され得る。使用され得る亜鉛含有化合物は、 ZnCl_2 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 ZnBr_2 、および ZnSO_4 を含むが、それらに限定されない。そのいずれ

かは、それらの無水または水和（すなわち「 $\cdot H_2O$ 」）形態で存在し得る。好ましくは、使用される亜鉛含有化合物は、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ である。本発明の無タンパク質培地において、亜鉛濃度は、単なる日常的な実験を用いて最適化され得る。代表的には、本発明の1×培地中の亜鉛の濃度は、約0.07～0.73mg/Lであり得、そして好ましくは約0.354mg/Lである。これらの成分の各々は、商業的に（例えば、Sigma (Saint Louis, Missouri)から）得られ得る。

本発明の培地中に含まれ得るアミノ酸成分は、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、およびL-バリンを含む。これらのアミノ酸は、商業的に（例えば、Sigma (Saint Louis, Missouri) から）得られ得る。

本発明の培地中に含まれ得るビタミン成分は、ビオチン、塩化コリン、 $D-Ca^{++}$ ーパントテン酸、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、およびビタミン B_{12} を含む。これらのビタミンは、商業的に（例えば、Sigma (Saint Louis, Missouri) から）入手され得る。

本発明の培地中で用いられ得る無機塩成分は、1つ以上のカルシウム塩（例えば、 $CaCl_2$ ）、 $Fe(NO_3)_3$ 、 KCl 、1つ以上のマグネシウム塩（例えば、 $MgCl_2$ および／または $MgSO_4$ ）、1つ以上のマンガン塩（例えば、 $MnCl_2$ ）、 $NaCl$ 、 $NaHCO_3$ 、 Na_2HPO_4 、ならびに微量元素セレン、バナジウム、および亜鉛のイオンを含む。これらの微量元素は、種々の形態、好ましくは、 Na_2SeO_3 、 NH_4VO_3 、および $ZnSO_4$ の様な塩の形態で提供され得る。これらの無機塩および微量元素は、商業的に（例えば、Sigma (Saint Louis, Missouri)から）入手され得る。

この基本培地に、1つ以上のポリアニオン性またはポリカチオン性化合物を加えて本発明の完全培養培地を処方する；これらの化合物は、細胞が凝集することを防ぎ、そして懸濁液中における細胞の増殖を促進する。従って、本発明の完全培地は、インビトロにおいて哺乳動物細胞の懸濁培養を支持し得る。本発明の培地において、ポリアニオン性化合物は、好ましくは、ポリスルホン化合物また

はポリ硫酸化合物であり、より好ましくは、ヘパリン、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ペントサンポリ硫酸、プロテオグリカンなどであり、これらは、多数の商業的供給源から入手され得る（例えば、Sigma; St. Louis, Missouri; Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland）。本発明の培養培地における使用について特に好ましいのは、デキストラン硫酸である。デキストラン硫酸は、新鮮に処方された基本培地に添加され得るか、または実施例1に詳述されるように基本培地の溶液（上述のように調製される）中に処方され得る。このデキストラン硫酸の溶液はまた、 $1\times\sim 1000\times$ の処方物として、最も好ましくは、 $1\times$ 、 $10\times$ 、 $100\times$ 、 $500\times$ 、または $1000\times$ の処方物として調製され得、これは次いで培養培地中に適切に希釈されて、実施例1に詳述されるように本発明の完全培地中の $1\times$ 最終処方物を提供する。

デキストラン硫酸は、商業的に（例えば、Sigma (Saint Louis, Missouri) から）入手され得、そして好ましくは、平均分子量が約5,000～約500,000ダルトン、約5,000～約250,000ダルトン、約5,000～約100,000ダルトン、約5,000～約50,000ダルトン、約5,000～約25,000ダルトン、または約5,000～約10,000ダルトンのものである。最も好ましくは、本発明の培養培地において使用されるデキストラン硫酸は、約5,000ダルトンの分子量のものである。

ポリアニオン性化合物およびポリカチオン性化合物は、本発明に従って任意の

細胞（特に上皮細胞もしくは細胞株、および線維芽細胞もしくは細胞株）に使用され得、懸濁液において培養された細胞の凝集物の集合を予防する。このような細胞には、上皮細胞および線維芽細胞ならびにそれらの細胞株が挙げられる。このような上皮細胞および線維芽細胞は、特に、上記のそれらの細胞および細胞株であり、そして好ましくはCHO細胞、PER-C6細胞、および293細胞である。

本発明の培地を処方するために、ポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物（特に、デキストラン硫酸）が上記の基本培地に、凝集を予防するのに効果的な量か、または懸濁培養物を効果的に提供する量で添加される。例えば、約0～500mg/リットル、約1～250mg/リットル、約5～200mg/リットル、約10～150mg/リットル、または約50～125mg/リットルの濃度、そして最も好ましくは約10

0mg/リットルの濃度。同様の濃度が他のポリアニオン性化合物およびポリカチオン性化合物（例えば、上記の化合物）について本発明の完全培地を処方するために使用され得る。

本発明の培養培地の一例における、上記の成分の特定の組合せ、それらの濃度範囲、および好ましい濃度は、表1に示される。この特定の例は、デキストラン硫酸を使用するが、上記のポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物のいずれかが本発明の培地中で使用され得ることが理解されるべきである。

表1に列挙される上記の成分は、溶液中で一緒に混合される場合、本発明の完全培養培地を形成する。これらの完全培地は、以下により詳述されるように種々の哺乳動物細胞の培養における使用に適している。特に、本発明の完全培地は、懸濁液中の哺乳動物細胞（特に下記のように通常単層で培養される細胞）の培養を支持するために使用され得る。しかし、本発明の培地はまた、標準的な単層条件下で哺乳動物細胞を培養するのにも適している。

表1。代表的な動物上皮細胞培養培地の成分濃度。

成分	成分範囲 (mg/L)	約いい実施態様 (mg/L)	最も好ましい 実施態様 (mg/L)
アミノ酸	約 :	約 :	約 :
L-アラニン	0-100	0	0.00
L-アルギニン	200-600	360	355.6
L-アスパラギン	5-150	26	26.40
L-アスパラギン酸	10-350	75	75.00
L-アスライン	15-150	58	57.6
L-グルタミン酸	5-150	30	29.40
L-グルタミン	300-1200	600	585.00
グリシン	0-100	0	0.00
L-ヒスチジン	25-200	42	42.2
L-イノロイシン	50-400	190	190.00
L-ロイシン	100-500	280	280.00
L-リジン	100-500	200	204.0
L-メチオニン	25-250	115	115.00
L-フェニルアラニン	15-200	70	70.00
L-プロリン	0-100	0	0.00
L-セリン	5-500	250	250.00
L-スレオニン	15-400	60	60.00
L-トリプトファン	5-100	20	20.00
L-チロシン	15-150	70	69.2
L-バリン	50-500	200	190.00

表1 (続き)

成分	成分範囲 (mg/L)	好ましい 実施態様 (mg/L)	最も好ましい 実施態様 (mg/L)
他の成分	約 :	約 :	約 :
エタノールミソ	0.5-5	3	3.2
D-グルコース	2500-9000	4500	4500.00
HEPES	1000-7000	3000	2980.00
インスリン	5-25	10	10.00
リノレイン酸	0.01-5.0	0.1	0.06
リボ酸	0.2-15	2	2.00
フェルレド [®]	0.5-30	1	1.00
PLURONIC F68	0-750	300	300.00
アトレシン	0.01-1	0.1	0.087
ピルビン酸ナトリウム	10-500	110	110.00
トランスフェリン	3-100	5	5.00
ビタミン類			
ビオチン	0.001-1	0.1	0.097
塩化コリン	1-100	14	14.00
D-Ca ⁺⁺ -パントテン酸	0.2-10	1	1.19
葉酸	1-100	5	5.00
イノシトール	2-200	18	18.00
ナイアシンアミド	0.1-10	1	1.22
ピリドキシン	0.1-10	0.9	0.85
リボフラビン	0.02-5	0.2	0.22
チアミン	0.1-10	1	1.00
ビタミンB12	0.05-10	1	1.03
デキストラン硫酸 分子量 5000	50-250	100	100

表1 (続き)

成分	成分範囲 (mg/L)	好ましい実施態様 (mg/L)	最も好ましい 実施態様 (mg/L)
無機塩類	約 :	約 :	約 :
カルシウム塩 (例えば CaCl_2)	0-100	10	11.10
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3^*$	0.25-1.5	0.8	0.810
KCl	10-500	275	276.30
MgCl_2	25-150	75	76.20
MgSO_4	5-150	25	24.10
マンガン塩 (例えば MnCl_2)	0.00001- 0.0005	0.0001	0.0001
NaCl	3000-9000	4400	4410.00
NaHCO_3	100-4000	2400	2400.00
Na_2HPO_4	10-750	125	125.00
セレン塩 (例えば Na_2SeO_3)	0.0000005- 0.00002	0.000005	0.0000067
バナジウム塩 (例えば NH_4VO_3)	0.00005- 0.002	0.0006	0.0006
亜鉛塩 (例えば ZnSO_4) [*]	0.001-0.15	0.1	0.0874

* $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ および亜鉛塩濃度は、無タンパク質完全培地においてより高濃度であり得る（上記を参照のこと）。

いくつかの適用について、本発明の完全培地の栄養内容をさらに強化してより速い増殖、および培養される細胞による生物学的製剤の産生の促進を支持し、そして培養条件の面倒な (fastidious) 哺乳動物細胞の培養にとってより適切な環境を提供することが好ましくあり得る。このような強化を達成するために、1つ以上の補充物が必要に応じて本発明の基本培地または完全培地に添加され得る。本発明の培地に有利に添加され得る補充物は、1つ以上のサイトカイン（例えば、EGF、aFGF、bFGF、IGF-1、IGF-2、HB-EGF、KGF、HGFなどのような増殖因子）

、
ヘパリン (FGF、HB-EGF、KGF、およびHGFのようなヘパリン結合増殖因子を安定化させるため)、および動物（例えば、HSAまたはBSA）、酵母（例えば、酵母抽出物、イーストレート (yeastolate)、または酵母抽出物限外濾過物）、植物（

例えば、イネペプチドまたはダイズペプチド)に由来する1つ以上のペプチドを含む。サイトカインは天然であってもよく組換えであってもよく、例えば、Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland)またはR&D Systems, Inc. (Rochester, Minnesota)から市販されており、そして培養される特定の細胞型について製造者が推奨する濃度(代表的には最終濃度が約0.00001~10mg/リットル)にて基本培地に添加され得る。ヘパリンは市販されており(例えば、Sigma (St. Louis, Missouri)から)、そして好ましくは、培地中の最終濃度が約1~500 USPユニット/リットルで使用するブタ粘膜ヘパリンである。動物ペプチド、酵母ペプチド、および植物ペプチドは、商業的に入手され得る(例えば、動物ペプチドについてSigmaから;酵母ペプチドについてDifco, Norwell, Massachusettsから;および植物ペプチドについてQuest International, Norwich, New Yorkから)か、または誘導体化され得、そして同時係属中の共有に係る米国特許出願番号60/028,197号(1996年10月10日出願)(その開示は、その全体が本明細書中で参考として援用される)に詳述されるように、本発明の培養培地へと処方される。

基本培地成分および完全培地成分ならびに必要な応じた補充物は、液体キャリア中に溶解され得るかまたは乾燥形態で維持され得る。表1に示される好ましい濃度(すなわち、「1×処方物」)で液体キャリア中に溶解される場合、培地のpHは、約7.0~7.6、好ましくは約7.1~7.5、そしてもっとも好ましくは約7.2~7.4に調整されるべきである。本培地の浸透圧はまた、約260~約300 mOsm、好ましくは約265~約280 mOsm、そして最も好ましくは約265~約275 mOsmに調整されるべきである。溶液中に成分を溶解するのに使用される液体キャリアの型および方法は変化し、そして日常の実験のみで当業者により決定され得る。代表的には、培地成分は、任意の順序で添加され得る。

好ましくは、個々の成分を含む溶液は、1×培地処方物における同一の成分の濃度よりも高く濃縮される。成分は、10倍濃縮(10×処方物)、25倍濃縮(25×処方物)、50倍濃縮(50×処方物)、または100倍濃縮(100×処方物)であり得る。

より高く濃縮された処方物は、成分が可溶性でかつ安定のままである限り作製され得る。米国特許第5,474,931号を参照のこと。この特許は、高濃度で培養

培地成分を可溶化する方法に関する。

個々の培地成分が別々の濃縮溶液として調製される場合、適切な（充分な）量の各々の濃縮物を希釈液と合わせて1×培地処方物を生成する。代表的には、使用される希釈物は水であるが、他の溶液（水性緩衝液、水性生理食塩水溶液、または他の水性溶液を含む）も、本発明に従って使用され得る。

本発明の培養培地は、代表的に、滅菌化され、所望されない夾雑物を予防する。滅菌は、滅菌培養培地を生成するために濃縮成分を混合した後に、例えば、約0.22 μm または0.45 μm 孔サイズの低タンパク質結合膜フィルター（例えば、MilliPore, Bedford, Massachusettsから市販される）を通す濾過により、達成され得る。あるいは、成分の濃縮サブグループは、濾過滅菌され得、そして滅菌溶液として保存され得る。次いで、これらの滅菌濃縮物は、無菌条件下で滅菌希釈液と混合されて濃縮]×滅菌培地処方物を生成し得る。オートクレーブまたは他の高温に基づく滅菌方法は好まれない。なぜなら、本発明の多くの培養培地成分が熱不安定性であり、そしてほとんどの加熱滅菌方法の間に達する温度のような温度により不可逆的に分解されるからである。

基本培地成分にとって最適な濃度範囲は、表1に列挙される。これらの成分を合わせて基本哺乳動物細胞培養培地を形成し得る。次いで、これは、上記のようにポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物（例えば、デキストラン硫酸）ならびに必要なに応じて1つ以上の補充物（例えば、1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、および／または1つ以上の動物ペプチド、酵母ペプチド、もしくは植物ペプチド）を補充され、本発明の完全培地を処方する。当業者に容易に明らかのように、所定の成分の濃度は、開示される範囲を超えて増減され得、そして濃度の増減の効果は、日常の実験のみを使用して決定され得る。好ましい実施態様において、本発明の培地の成分の濃度は、表1の一番右の欄に列挙される濃度であり、これは、ポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物（例えば、デキストラン硫酸）ならびに必要なに応じて1つ以上の補充物（例えば、1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、および1つ以上の動物ペプチド、酵母ペプチド、もし

くは植物ペプチド)を上記のように補充される。

当業者に容易に明らかなように、本発明の培養培地の各成分は、溶液中の1つ以上の他の成分と反応し得る。従って、本発明は、上記のように補充した表1に開示される処方物、ならびにこれらの成分を合わせた後に形成されるか、または合わせることににより得られる任意の反応混合物(すなわち、培養培地または他の反応混合物)を含む。

本発明の培地処方物の最適化は、Ham (Ham, R. G., Methods for Preparation of Media, Supplements and Substrata for Serum-Free Animal Culture, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 3-21(1984)) および Waymouth (Waymouth, C., Methods for Preparation of Media, Supplements and Substrata for Serum-Free Animal Culture, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 23-68(1984)) により記載されるアプローチを使用して実施された。培地成分にとっての最適な最終濃度は、代表的には、経験的研究、単一成分滴定研究、または歴史的および現在の科学文献の解釈のいずれかにより同定される。単一成分滴定研究では、動物細胞を用いて単一培地成分の濃度は変化させるが、すべての他の成分および変数は、一定に維持し、そして単一成分の、動物細胞の生存可能性、増殖または係属した健常性への影響を測定する。

交換培養培地の処方

本発明の交換培地では、任意の基本培地が用いられ得る。このような基本培地は、1以上のアミノ酸、1以上のビタミン、1以上の無機塩、1以上の緩衝塩、および1以上の脂質を含み得る。本発明によれば、トランスフェリンは、鉄もしくは鉄含有化合物で置換され、そして/またはインスリンは、亜鉛もしくは亜鉛含有化合物で置換される。好ましくは、鉄キレート化合物は、本発明に従って使用される。

用いられ得る Fe^{2+} および/または Fe^{3+} キレート化合物は、 Fe^{2+} および/または Fe^{3+} 塩ならびにキレート剤(例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレングリコールビス(β -アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、デフェロキサミンメシレート、ジメルカプトプロパノール、ジエチレントリアミ

ン五酢酸 (DPTA)、およびトランス-1,2-ジアミノシクロヘキサン-N,N',N'-四酢酸 (CDTA)) を含有する化合物を含むがこれらに限定されない。例えば、鉄キレート化合物は、クエン酸第二鉄キレートまたは硫酸第一鉄キレートであり得る。好ましくは、用いられる鉄キレート化合物は、硫酸第一鉄・7H₂O・EDTA (FeSO₄・7H₂O・EDTA、例えば、SigmaF0518, Sigma, St. Louis, MO) である。本発明の培地では、Fe²⁺ および／またはFe³⁺ の濃度は、日常的な実験のみを用いて最適化され得る。代表的には、本発明の1×培地中のFe²⁺ および／またはFe³⁺ の濃度は、約0.00028~0.011g/Lであり得る。好ましくは、鉄の濃度は、約0.0011g/Lである。

用いられ得るZn²⁺ 含有化合物は、ZnCl₂、Zn(NO₃)₂、ZnBr₂、およびZnSO₄・7H₂Oを含むがこれらに限定されない。好ましくは、用いられるZn²⁺ 化合物は、硫酸亜鉛・7H₂O (ZnSO₄・7H₂O) である。本発明の培地では、Zn²⁺ の濃度は、日常的な実験のみを用いて最適化され得る。代表的には、本発明の1×培地中のZn²⁺ の濃度は、約0.00007~0.00073g/Lであり得る。好ましくは、Zn²⁺ の濃度は、約0.000354g/Lである。

用語「抗凝集剤」とは、培養物中の細胞が互いに凝集する程度を減少させる化合物をいう。好ましくは、抗凝集剤は、ポリアニオン性またはポリカチオン性の化合物である。ポリアニオン性化合物は、好ましくは、ポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物、好ましくはデキストラン硫酸、ペントサンポリ硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、プロテオグリカンなどである。より好ましくは、抗凝集剤は、デキストラン硫酸またはペントサンポリ硫酸である。最も好ましくは、抗凝集剤は、デキストラン硫酸であり、これは、好ましくは、約5,000ダルトンの分子量を有する。

抗凝集剤は、懸濁培養において増殖した細胞の凝集を減少させ、組換えタンパク質発現および／またはウイルス産生のレベルを増加させるために用いられ得る。本発明は、細胞凝集を防止するため、および／または組換えタンパク質発現のレベルを増加させるために十分な量のポリアニオン性またはポリカチオン性の化合物（好ましくは、デキストラン硫酸）を含有する真核生物細胞培養培地を提供する。

本培地にポリアニオン性またはポリカチオン性の化合物（好ましくは、デキス

トラン硫酸）を含むことは、細胞の凝集を阻害する；従って、懸濁細胞が凝集するかまたは凝集体を形成する傾向がある伝統的な無血清培地とは異なり、本培地は、懸濁物中の単細胞の培養を促進する。これらの懸濁培養条件下で細胞を培養する能力は、迅速な継代培養および高密度培養を提供し、これは下記のような生物学産業においてのように、哺乳動物細胞が種々の産物を産生するために用いられる適用に有利である。さらに、本培地は、無血清および低タンパク質または無タンパク質であるので、培地は、哺乳動物細胞上でのインビトロでの生物製剤（例えば、ウイルス、組換えポリペプチドなど）の迅速な産生および単離のため、ならびに種々のリガンド（例えば、タンパク質、ホルモン、合成有機薬物、または合成無機薬物など）の結合および／または活性を測定するアッセイにおいて用いられ得る。

デキストラン硫酸およびペントサンポリ硫酸は、例えば、Sigma (St. Louis, Missouri) から市販され得る。デキストラン硫酸は、好ましくは、約5,000～約500,000ダルトン、約5,000～約250,000ダルトン、約5,000～約100,000ダルトン、約5,000～約50,000ダルトン、約5,000～約25,000ダルトン、または約5,000～約10,000ダルトンの平均分子量のものである。最も好ましくは、本培養培地において用いられるデキストラン硫酸は、約5,000ダルトンの分子量のものである。

本発明の1×培地のpHは、好ましくは、約6.9～約7.3であるべきである。本発明の1×培地の重量オスモル濃度は、好ましくは、約270～約350mOsmであるべきである。所望ならば、重量オスモル濃度は、NaClのような適切な塩を添加することにより増加され得る。好ましい濃度の成分（表2）が用いられる場合、オスモル濃度は調整されなければならないことはない。

培地成分は、液体キャリア中に溶解され得るか、または乾燥形態で維持され得る。液体キャリアの型および成分を溶液中に溶解するために用いられる方法は変化し、そして当業者により、単に日常的な実験を用いて決定され得る。

好ましくは、成分を含む溶液は、1×培地処方物の同じ成分の濃度より濃縮される。成分は、10倍濃縮（10×処方物）、25倍濃縮（25×処方物）、50倍濃縮（

50倍濃度)、または100倍濃縮(100×処方物)であり得る。より高度に濃縮された処方物が作製され得るが、ただし成分は可溶性および安定なままである。米

国特許第5,474,931号を参照のこと。

培地成分が別々の濃縮溶液として調製される場合、適切な(十分な)量の各濃縮物が希釈剤と組み合わされて1×培地処方物を生じる。代表的には、用いられる希釈剤は水であるが、他の溶液(水性緩衝液、水性生理食塩水溶液、または他の水溶液を含む)が本発明に従って用いられ得る。

本発明の培養培地は、代表的には、細胞培養培地の所望しないコンタミネーションを防止するために滅菌される。滅菌は、例えば、濃縮された成分を混合した後の濾過によって無菌培養培地を生じることにより達成され得る。あるいは、濃縮された成分のサブグループを、フィルター滅菌し、そして無菌溶液として保存し得る。次いで、これらの無菌濃縮物は、無菌の希釈剤と混合されて濃縮された1×無菌培地処方物を生じ得る。

本発明の培地は、哺乳動物細胞、そして特に上記のように上皮細胞および細胞株、ならびに線維芽細胞および細胞株の、特に高密度までの増殖を促進し、培養細胞における組換えタンパク質の発現のレベルを増加させ、そして/または培養細胞におけるウイルス産生を増加させる。細胞の代謝エネルギーは、細胞増殖および組換えタンパク質発現の両方で消費される。培養条件および特定の細胞株に依存して、細胞増殖または組換えタンパク質発現のいずれかが、他方の活性を犠牲にして促進され得る。

細胞増殖を支持することからタンパク質発現を支持することへと代謝エネルギーの分配をシフトするために、細胞は、酪酸ナトリウムで処理され得る(De Gros, G. S.ら, Lymphokine Res. 4:221-227(1985))。約10 μ M~約10mMの酪酸ナトリウムが用いられ得る。好ましくは、約100 μ M~1.0mMが用いられる。細胞を、酪酸ナトリウムの添加の前に所望の密度まで増殖させ得る。酪酸ナトリウムを添加した後、細胞増殖は緩徐になり、そして組換えタンパク質発現は増加する。酪酸ナトリウムでの処理は細胞増殖の速度を減少させるが、この増殖速度の減少よりも、組換えタンパク質生成の増加が勝っている。さらに、本発明の培地は無

タンパク質であるので、組換えタンパク質の精製は、血清またはタンパク質を含有する培地中で増殖させた細胞から行われ得る精製よりもより迅速に、より容易に、そしてより安価に行われ得る。米国特許5,393,558号もまた参照のこと。

ジヒドロ葉酸リダクターゼ (DHFR) は、プリン、アミノ酸、およびヌクレオシド合成に必要とされるテトラヒドロ葉酸への葉酸の変換を触媒する。葉酸アナログであるメトトレキセートは、DHFRに結合しそしてこれを阻害し、細胞死を生じる。目的の遺伝子およびメトトレキセート耐性遺伝子でトランスフェクトしたDHFR欠損細胞 (DHFR⁻) をメトトレキセートで処理して組換え細胞を増幅し得る (Bebbington, C.R. ら, The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells, DNA Cloning, 第3巻, Glover, D. 編, Academic Press(1987), 163-188頁)。連続的に増加する濃度のメトトレキセートに曝露した細胞の生存集団は、遺伝子増幅の結果、増加したレベルのDHFRを含む。

約50nM~約2 μ Mのメトトレキセートが用いられ得る。好ましくは、約100nM~約500nMのメトトレキセートが用いられる。メトトレキセートでの処理は全体的な細胞密度を減少し得るが、この細胞密度の減少よりも、組換えタンパク質生成の増加が勝っている。さらに、本発明の培地は無タンパク質であるので、組換えタンパク質の精製は、血清またはタンパク質を含有する培地で増殖させた細胞から行われ得る精製よりもより迅速に、より容易に、そしてより安価に行われ得る。

1×培地の成分が増殖（そして特に高密度増殖）を支持すると考えられ、培養細胞における組換えタンパク質の発現のレベルを増加させ、そして／または培養におけるウイルスの産生を増加させる濃度範囲は、表2の第2欄に列挙される。これらの成分を組み合わせて本発明の1×真核生物細胞培養培地を形成し得る。当業者に明らかなように、所定の成分の濃度は、開示された範囲を越えて増加または減少させ得、そして増加または減少させた濃度の効果は日常的な実験のみを用いて決定され得る。本発明の培地の好ましい実施態様での各成分の濃度は、表2の第3欄に列挙される。特に好ましい実施態様での各成分の濃度は、表2の第

4 欄に示される。

本発明の1×培地は、培地濃縮技術を用いて作製され得る。米国特許第5,474,931号を参照のこと。成分は、溶液中で保存され得る。好ましくは、成分は、濃縮溶液中にグループ分けされ、そして保存される。例えば、表2は、成分の適切なグループを示す。グループ分けされた成分のストック溶液は、濃縮ストックと

して作製され得る。例えば、10×～100×の化学的ストック溶液を作製することが可能である。このストック溶液は、後の使用のために適切なアリコートサイズで液体としてまたは凍結して保存され得る。

ストック溶液は、多数の利点を提供する。例えば、より高い最終濃度の所定の成分は、1×培地において用いられ得る。さらに、いくつかの成分は、濃縮ストック溶液中で保存される場合、より安定である。さらに、1×培地について必要とされるよりも少ない保存容量が、濃縮ストック溶液のために必要とされる。米国特許第5,474,931号を参照のこと。

好ましい実施態様において、表2における成分の群の27.63×濃縮貯蔵溶液を、以下のように調製する。酸溶解性I群の成分の26.63×濃縮貯蔵溶液を調製するために、表2における酸溶解性I群の成分中の各成分を、約19.33mLの蒸留水に添加する。酸溶解性I群中の成分を、任意の順序で添加し得る。溶液のpHを、5N HCl（約7.4mL）で0.80に減少させ、そして全ての成分が溶解するまで溶液を混和する。溶液の最終容量は、36.192mLである。

酸溶液II群の成分の27.63×濃縮貯蔵溶液を調製するために、リン酸ナトリウムを約39.33mLの蒸留水に最初に添加し、そしてリン酸ナトリウムが完全に溶解するまで溶液を混和する。pHを、5N HCl（約3.5mL）を用いて1.00に調整する。表2における酸溶解性II群中の残りの成分を添加する（これらの残りの成分の添加順序は重要ではない）。微量元素の濃縮貯蔵溶液を使用し得る。酸溶解性II溶液を、全ての成分が溶解するまで混和する。最終pHは、1.00であるべきである。必要ならば、pHを1.00に調整するべきである。溶液の最終容量は36.192mLである。

塩I溶液の27.63×濃縮貯蔵溶液を調製するために、MgCl₂およびアスコルビン

酸リン酸Mg塩を、約35.83mLの蒸留水に添加する。成分が溶解するまで溶液を混和する。pHを、5N HCl（約6.0mL）を用いて5.5まで低下させる。D-パントテン酸Ca、硝酸カルシウム、およびKClを添加し、そして混和する。混和の後、pHは5.50であるべきである。必要ならば、pHを5.50に調整するべきである。溶液の最終容量は、36.192mLである。

塩II溶液の27.63×濃縮貯蔵溶液を調製するために、pluronic F-68、続いてリン酸ナトリウムを約28.23mLの蒸留水に添加する。混和後、5N HCl（約0.06mL）

を用いてpHを7.00に減少させる。グルコース、続いて葉酸およびリボフラビンを除く表2における塩II群中の成分の残りの成分（葉酸およびリボフラビンを除く、これらの成分の残りの添加順序は重要ではない）を添加する。好ましくは、蒸留水中の亜セレン酸ナトリウムの10,000×貯蔵溶液が使用される。 β -メルカプトエタノールの密度は好ましくは1.114g/mL、およびモノチオグリセロールの密度は好ましくは1.250g/mLである。

2 mLの遮光した蒸留水の分別容器中に、葉酸およびリボフラビンを添加する。5N HCl（約7 μ L）を用いてpHを11.5に調製し、そして葉酸およびリボフラビンが溶解するまで溶液を混和する。次いで、この葉酸およびリボフラビンの溶液を、塩II成分溶液に添加する。塩II溶液の最終容量は36.193mLであり、そして最終pHは7.00であるべきである。必要ならば、pHは7.00に調整され得る。

塩II溶液については、pluronic F-68は、液体形態または粉末形態であり得る。酸溶解性I溶液、酸溶解性II溶液、塩I溶液、または塩II溶液については、上に記載されない限り、成分は、単独または組合わせて溶液に添加され得る。

本発明のI×培地を調製するために、以下の手順が好ましく使用される。840.00mLの蒸留水（pH5.61）に、36.192mLの酸溶解性I群の成分の27.63×濃縮物（pH1.77）、続いて36.192mLの酸溶解性II群の成分の27.63×濃縮物（pH1.71）、続いて約9.800mLの5N NaOH（pH6.8）、続いて36.192mLの塩I群の成分の26.63×濃縮物（pH6.8）、続いて36.192mLの塩II群の成分の26.63×濃縮物（pH6.85）、続いて1.810mLの硫酸第一鉄キレート（pH6.85）、続いて2.22gのNaHCO₃（pH7.16）、続いて約0.400mLの5N HCl（pH7.00）、続いて0.427gのNaClを添加する。溶液

の最終pHは7.00であるべきであり、そして最終容量は1000mLであるべきである。溶液の容量オスモル濃度の範囲は、約320と330mOsmとの間であるべきである。40 mLの200mMグルタミン溶液（100×）を、使用時に1×培地に添加する。

鉄キレート化合物を、フィルター滅菌の前に、好ましくは1×培地に添加する

。

デキストラン硫酸を、約1 μ g/ml～約1mg/mlの最終濃度まで1×培地に添加し得る。好ましくは、デキストラン硫酸の最終濃度は、約10～約25 μ g/mlである。デキストラン硫酸を、1×培地のフィルター滅菌の前に添加し得る。あるいは、予め滅菌したデキストラン硫酸を、滅菌1×培地に添加し得る。デキストラン硫

酸が濃縮貯蔵溶液に含まれる場合、それは塩II群の成分に含まれ得る（表2を参照のこと）。他の抗凝集剤の濃度を、日常的な実験のみを用いて決定し得る。

当業者に明らかであるように、成分は溶液中で反応し得る。従って、本発明は、表2に開示される処方物、ならびに表2における成分が合わせられた後に形成する任意の反応混合物を含む。

表 2

1×交換培地処方物

酸溶解性 I

成分	濃度範囲 (G/L)	好ましい 実施態様 (G/L) 約	特に好ましい 実施態様 (G/L)
L-アルギニン	0.1000-0.7200	0.4	0.36192
L-アスパラギン・H ₂ O	0.1000-1.8000	0.9	0.90480
L-アスパラギン酸	0.0100-0.3600	0.2	0.18096
L-グルタミン酸	0.1000-0.6000	0.3	0.27144
L-ヒスチジン	0.0600-0.3600	0.2	0.18096
ヒドロキシ-L-プロリン	0.0040-0.3600	0.2	0.18096
L-ノロイシン	0.1000-0.7200	0.4	0.36192
L-ロイシン	0.1000-1.1000	0.5	0.54288
L-リジン・HCl	0.2000-1.1000	0.5	0.54288
L-メチオニン	0.0500-0.2400	0.1	0.12667
L-フェニルアラニン	0.0900-0.4200	0.2	0.21715
L-プロリン	0.0500-1.1000	0.5	0.54288
L-セリン	0.1000-1.1000	0.5	0.54288
L-スレオニン	0.1000-0.7200	0.4	0.36192
L-トリプトファン	0.0200-0.4200	0.2	0.20810
L-チロニン	0.1000-0.3600	0.2	0.18096
L-バリン	0.1000-0.7200	0.4	0.36192
L-シスチン・2HCl	0.0200-0.2200	0.1	0.10496

表2 (続き)

酸溶解性II

成分	濃度範囲 (G/L)	好ましい 実施態様 (G/L)	特に好ましい 実施態様 (G/L)
Na ₂ HPO ₄ (・黒水)	0.2000-2.5000	0.6	0.63336
塩化ナトリウム・HCl	0.0010-0.0072	0.004	0.00362
酢酸・HCl	0.0010-0.0072	0.004	0.00362
カルシウム	0.0006-0.0036	0.002	0.00181
硫酸亜鉛・7H ₂ O	0.0003-0.0032	0.002	0.00156
硫酸銅・5H ₂ O	0.000001-0.000009	0.000005	0.000004524
塩化カルシウム・5H ₂ O	0.000004-0.000040	0.00002	0.000020629
塩化コバルト・6H ₂ O	0.0000006-0.0000086	0.000004	0.000004343
塩化スズ・2H ₂ O	0.00000001-0.00000020	0.0000001	0.000000101
硫酸マグネシウム・H ₂ O	0.00000001-0.00000030	0.0000002	0.000000152
硫酸ニッケル・6H ₂ O	0.00000005-0.00000024	0.0000001	0.000000118
メタボタン酸トリウム	0.00000003-0.00000012	0.0000006	0.000000561
モリブデン酸ナトリウム・4H ₂ O	0.00000300-0.0000110	0.000005	0.000005429
酢酸バリウム	0.00000065-0.00000240	0.000001	0.000001176
臭化カリウム	0.00000003-0.00000011	0.00000005	0.000000054
ヨウ化カリウム	0.000000045-0.00000016	0.00000008	0.000000081
硫酸コバルト	0.000000165-0.00000060	0.0000003	0.000000299
フッ化ナトリウム	0.00000105-0.00000360	0.000002	0.000001810
硫酸銀	0.000000045-0.00000016	0.00000008	0.000000081
塩化ルビジウム	0.00000035-0.0000013	0.0000006	0.000000633
塩化ジルコニウム	0.00000008-0.00000029	0.000001	0.000001448
塩化アルミニウム	0.00000003-0.00000011	0.00000005	0.0000000543
二酸化ジルコニウム	0.000000135-0.00000049	0.0000002	0.000000244
四酸化チタン	0.00000025-0.0000009	0.0000005	0.000000452
メタゲイ酸トリウム	0.00005-0.00095	0.0005	0.000452400

表2 (続き)

塩 I

成分	濃度範囲 (g/L)	好ましい 実施態様 (g/L) 約	特に好ましい 実施態様 (g/L)
MgCl ₂ (無水)	0.0100-0.1400	0.07	0.06985
D-パントタン酸カルシウム	0.0020-0.0060	0.004	0.00362
硝酸カルシウム 4H ₂ O	0.01800-0.3600	0.09	0.09048
KCl	0.3340-1.4500	0.7	0.72384
アスコルビン酸リ酸Mg塩	0.00199-0.040	0.02	0.01991

表2 (続き)

塩 II

成分	濃度範囲 (g/L)	好ましい 実施態様 (g/L) ABOUT	特に好ましい 実施態様 (g/L)
Pluronic F68, 10% 溶液	5.0 mL-40.0 mL/L (0.5-4.0 g/L)	18 mL/L (2 g/L)	18.096 mL/L (1.8096 g/L)
Na ₂ HPO ₄ (無水)	0.018-0.360	0.09	0.09048
D-グルコース	1.000-12.60	6	6.33360
葉酸	0.002-0.0072	0.004	0.00362
リボフラビン	0.0002-0.00072	0.0004	0.000362
ピオクシン	0.000575-0.00360	0.002	0.00181
塩化コリン	0.0280-0.1810	0.09	0.09048
チアミンイミド	0.0003-0.00724	0.004	0.00362
イノシトール	0.0260-0.127	0.06	0.06334
ピルビン酸ナトリウム	0.070-0.400	0.2	0.19906
ビタミン B-12	0.0005-0.0018	0.0009	0.00090
β-メルカプトエタノール	0.00014-0.00282	0.001	0.00141
パラ-アミ安息香酸	0.0010-0.00362	0.002	0.00181
β-ケロセロホスフェート	0.090-1.800	0.9	0.90480
亜セレン酸ナトリウム	0.00000157-0.000032	0.00002	0.0000157
エタノールアミン・HCl	0.0075-0.0280	0.01	0.01357
スチロルミン	0.0009-0.0181	0.009	0.00905
プロレアン・2HCl	0.00012-0.00110	0.0005	0.000543
エチレングリセロール	0.0100-0.0362	0.02	0.01810

表2 (続き)
乾燥粉末培地

成分	濃度範囲 (G/L)	好ましい 実施態様 (G/L) 約	特に好ましい 実施態様 (G/L)
NaHCO ₃	1-4	2	2.22

鉄キレート化合物を、フィルター滅菌の前に、好ましくは1×培地に添加する。

グルタミンを使用する場合、グルタミンを、フィルター滅菌の前に1×培地に添加し得る。例えば、40mlの200mM L-グルタミンを、1×培地／リットルに添加し得る（グルタミンの最終濃度は8mMである）。グルタミンを添加しない場合、次いで、上記の各成分の濃度を、好ましくは希釈剤で1.04-倍／Lに希釈するべきであるが、希釈は必須ではない。あるいは、200mMのL-グルタミンの滅菌貯蔵溶液を、1×培地をフィルター滅菌した後に添加し得る。

グルタミンシンターゼ発現系（Celltech, Slough, UK）を使用する場合、1×培地をグルタミンで補充する必要はない。この系を使用して、細胞をグルタミンシンターゼ（これは、グルタミン酸およびアンモニアからのグルタミンの合成を触媒する）を発現するように操作する。米国第5,122,464号を参照のこと。

NS/O骨髓腫細胞を培養するのに効果的な1×培地について、脂質混合補充物を、1×培地に添加する必要があると得る。表3の脂質補充処方物を、フィルター滅菌の前に1×培地に添加し得る。好ましくは、脂質混合補充物の200～400×濃縮貯蔵溶液を使用する。好ましい実施態様において、脂質混合補充物を、379×濃縮貯蔵溶液として調製し、この2.64ml/Lを1×培地に添加する。脂質補充物を作製するために、エタノールを、60℃で一定に攪拌しながらPluronic F68に添加する。混合物を37～40℃に冷却し、そしてステロールを添加する。混合物上にアルゴンガスを重層し、そしてステロールが溶解するまで混和する。ステロールが溶解した後、表3における残りの成分を添加する。この脂質混合補充物を、将来の使用のために貯蔵し得る。ステロールは、コレステロールまたは植物ステロール

(例)

例えば、シトステロールもしくはスチグマシテロール、または当業者に公知の他の植物ステロール) であり得る。

表3。脂質補充物(1×交換培地中の最終濃度)。

成分	濃度範囲 (G/L)	好ましい 実施態様 (G/L) ABOUT	特に好ましい 実施態様 (G/L)
Pluronic F68	0.1-4.0	1.7	1.74
エタノール	0.09-2.0	0.9	0.87 mL
コレステロール	0.0007-0.07	0.007	0.00696
リボ酸	0.00003-0.003	0.0003	0.000296
リノール酸	0.00001-0.001	0.0001	0.000122
α-トコフェロール	0.00002-0.002	0.0002	0.000231
パルミチン酸	0.0002-0.02	0.002	0.00174
オレイン酸	0.0002-0.02	0.002	0.00174
トリノールオキスアチルコリン	0.0002-0.02	0.002	0.00174
ステアリン酸	0.0002-0.02	0.002	0.00174
リノ酸	0.0002-0.02	0.002	0.00174
パルミトリン酸	0.0002-0.02	0.002	0.00174
ミリスチン酸	0.0002-0.02	0.002	0.00174

キット

本発明はまた、哺乳動物細胞、特に哺乳動物上皮細胞の培養における使用のためのキットを提供する。本発明によるキットは、1つ以上の本発明の培地処方物を含む1つ以上の容器を含む。例えば、本発明のキットは、第一の容器が、上記のように調製された完全無血清培養培地、低タンパク質培養培地、または無タンパク質培養培地を含む、1つ以上の容器を含み得る。

本発明のさらなるキットは、第一の容器が上記のように調製された基本培養培地を含み、そして第二の容器が、ポリアニオン性化合物またはポリカチオン性化合物、好ましくはポリスルホン化合物またはポリ硫酸化合物、より好ましくはヘパリン、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ペントサンポリ硫酸、プロテオグリカンなど、そして最も好ましくはデキストラン硫酸を含む、1つ以上の容器を含み得る。これらのキットの容器中に

含まれる完全培地、基本培地、および／またはデキストラン硫酸は、1×即使用可能な処方物として、またはより濃縮された溶液（例えば、2×、5×、10×、20×、25×、50×、100×、500×、1000×、またはそれ以上）として存在し得る。本発明のさらなるキットは、1つ以上のサイトカイン、ヘパリン、1つ以上の動物ペプチド、1つ以上の酵母ペプチド、および1つ以上の植物ペプチドからなる群から選択される1つ以上の補充物を含む1つ以上のさらなる容器を、さらに含み得る。本発明のキットの容器への封入のための、好ましいサイトカイン、ヘパリン、動物ペプチド、酵母ペプチド、および植物ペプチドは、上記のようである。本発明のキットは、下記のような種々の適用における使用のための、本発明の1つ以上の培養培地を産生するために使用され得る。

組成物

本発明はさらに、本発明の培地を含む組成物を提供する。本発明のこの局面による組成物は、1つ以上の本発明の培地、および必要に応じて1つ以上のさらなる成分（例えば、1つ以上の細胞、1つ以上の組織、1つ以上の器官、1つ以上の生物体、1つ以上のウイルス、1つ以上のタンパク質またはペプチド（例えば、1つ以上の酵素）、1つ以上のホルモン、1つ以上の核酸、1つ以上の酵素基質、1つ以上のサイトカイン、1つ以上の細胞外マトリックス成分（付着因子を含む）、1つ以上の抗体、1つ以上の検出可能な標識試薬（例えば、フルオロフォア、ホスフォア、または放射標識）など）から構成され得る。

本発明の特に好ましい組成物は、1つ以上の本発明の培養培地、および1つ以上の哺乳動物細胞を含む。上記のように、哺乳動物細胞および細胞株は、本発明の組成物中で使用され得る。本発明の細胞培養組成物（本発明の懸濁培地を含む）の処方における使用に特に適切な哺乳動物細胞は、組織試料（例えば、ケラチノサイト、頸部上皮細胞、気管支上皮細胞、気管上皮細胞、腎上皮細胞、もしくは網膜上皮細胞由来の初代細胞、または形質転換細胞もしくは樹立細胞株（例えば、293ヒト胚腎細胞、HeLa頸部上皮細胞またはその誘導體（例えば、HeLaS3）、PER-C6ヒト網膜細胞およびHCATヒトケラチノサイト）、またはそれらの誘導體であり得るヒト起源の上皮細胞を含む。本発明の懸濁培地の本組成物におけ

る使用に最も好ましいものは、293ヒト胚腎細胞である。本発明のこのような好ましい組成物において使用される細胞は、正常細胞であり得るか、または必要に応じて罹患され得るかもしくは遺伝子改変され得る。CHO細胞、COS細胞、VERO細胞、BHK細胞（BHK-21細胞を含む）、およびそれらの誘導体のような他の哺乳動物細胞もまた、本細胞培養組成物の処方における使用に適切である。

上記のように、哺乳動物細胞および細胞株は、本組成物において使用され得る。本発明の交換培地の本組成物における使用に最も好ましいものは、CHO細胞である。本発明のこのような好ましい組成物において使用される細胞は、正常細胞であり得るか、または必要に応じて罹患され得るかもしくは遺伝子改変され得る。293細胞、COS細胞、VERO細胞、BHK細胞（BHK-21細胞を含む）、およびそれらの誘導体のような他の哺乳動物細胞もまた、本細胞培養組成物の処方における使用に適切である。

動物由来、または当該分野において日常的な方法を用いてインビトロもしくはインビボで構築された上皮組織、器官、および器官系が、本発明の懸濁組成物および置換組成物を処方するために同様に使用され得る。

本発明の組成物は、無血清培地、低タンパク質培地、または無タンパク質培地における哺乳動物細胞の即使用可能な培養物、特に懸濁培養物を必要とする、種々の医療適用（診断適用および治療適用を含む）、産業的適用、法医学的適用、および研究適用において使用され得る。これらの組成物の使用の非限定的な例には、貯蔵細胞培養物；細胞、組織、器官、生物体などの短期貯蔵または長期貯蔵を提供すること；ワクチン接種試薬を提供すること；などを含む。

培養培地の使用

本発明の細胞培養培地は、懸濁物または単層培養物中の種々の哺乳動物細胞の培養を促進するために使用され得る。特に、これらの培地は、上記のように、哺乳動物上皮細胞または細胞株、特にヒト上皮細胞および細胞株、ならびに線維芽細胞および細胞株を培養するために使用され得る。本発明の培地は、ラテックスまたはコラーゲンビーズのようなマイクロキャリアの使用なしに（細胞は、本発明の培地中で、そのようなマイクロキャリアまたはビーズ上で培養され得るが）

代表的には足場依存性であるかまたは単層培養物中で増殖させられる細胞の懸濁培養を有利に促進する。哺乳動物上皮細胞を含む種々の動物細胞の単離のための方法、ならびに懸濁および単層培養は、当該分野において公知であり（例えば、Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, New York: Alan R. Liss, Inc. (1983)を参照のこと）、そして以下および実施例においてさらに詳細に記載される。本発明の培地は懸濁物中の哺乳動物細胞の培養のために特に有用であるが、懸濁物中で、単層中で、環流培養物（例えば、中空糸微小管環流系）中で、半透過性支持体（例えば、フィルター膜）上で、複合多細胞整列中で、またはそれによって哺乳動物細胞がインビトロにおいて培養され得る任意のその他の方法でのいずれで細胞が増殖させられても、この培地は任意の標準的細胞培養プロトコルにおいて使用され得ることが理解されるべきである。

好ましい実施態様において、本発明の交換培地は懸濁培養物中でCHO細胞を増殖させるために使用される。別の好ましい実施態様において、本発明の交換培地は、懸濁培養物中でハイブリドーマ細胞を増殖させるために使用される。なお別の好ましい実施態様において、本発明の交換培地は、懸濁培養物中でNS/Oミエローマ細胞を培養するために使用され得る。NS/Oミエローマ細胞が培養される場合、本発明の置換IX培地には、液体混合物補充物（表3を参照のこと）が補充され得る。

本発明の培地中に、ポリアニオン性またはポリカチオン性化合物（例えば、硫酸デキストラン）を含めることは、293細胞、CHO細胞の凝集、およびその他の哺乳動物細胞の凝集を阻害する；従って、その中で懸濁細胞が凝集するかまたは集塊（clump）を形成する傾向にある従来の無血清培地とは異なり、本発明の培地は、懸濁物中の単一細胞の培養を促進する。これらの懸濁培養条件下で細胞を培養する能力は、迅速な継代培養および高密度培養を提供し、これは、下記のように、バイオテクノロジー産業におけるような、種々の産物を生産するために哺乳動物細胞が使用される適用のために有利である。さらに、本発明の培地は無血清であり、そして低タンパク質またはタンパク質非含有であるので、この培地は生物学的物質（biological）（例えば、ウイルス、組換えポリペプチドなど）の迅

速な産生および単離のために、そしてインビトロにおける哺乳動物細胞に対する種々のリガンド（例えば、タンパク質、ホルモン、合成有機薬物もしくは合成無機薬物など）の結合および／または活性を測定するアッセイにおいて使用され得る。

本発明の培地中で増殖され得る細胞は、動物起源の細胞（哺乳動物から得られる細胞を含むがそれらに限定されない）である。本発明の培地中での培養のために特に適切である哺乳動物細胞としては、上皮細胞および細胞株が挙げられ、これは組織サンプルに由来する初代細胞であり得る。

本発明の培地は、以下を含む種々の哺乳動物細胞を培養するために使用され得る：初代上皮細胞（例えば、ケラチノサイト、頸部上皮細胞、気管支上皮細胞、気管上皮細胞、腎臓上皮細胞、および網膜上皮細胞）、ならびに樹立細胞株（例えば、293胚腎臓細胞、HeLa頸部上皮細胞、およびPER-C6網膜細胞、MDBK（NBL-1）細胞、CRFK細胞、MDCK細胞、CHO細胞、BeWo細胞、Chang細胞、Detroit 562細胞、HeLa 229細胞、HeLa S3細胞、Hep-2細胞、KB細胞、LS180細胞、LS174T細胞、NCI-H-548細胞、RPMI 2650細胞、SW-13細胞、T24細胞、WI-28 VA13, 2RA細胞、WISH細胞、BS-C-I細胞、LLC-MK₂細胞、Clone M-3細胞、I-10細胞、RAG細胞、T CMK-1細胞、Y-1細胞、LLC-PK₁細胞、PK(15)細胞、GH₁細胞、GH₃細胞、L2細胞、LLC-RC256細胞、MH₁C₁細胞、XC細胞、MDOK細胞、VSW細胞、およびTH-I, B1細胞、またはそれらの誘導体）、任意の組織または器官（心臓、肝臓、腎臓、結腸、腸、食道、胃、神経組織（脳、脊髄）、肺、血管組織（動脈、静脈、毛細血管）、リンパ系組織（リンパ節、腺系(adenoid)、扁桃、骨髓、および血液）、脾臓を含むがそれらに限定されない）由来の線維芽細胞、ならびに、線維芽細胞および線維芽細胞様細胞株（例えば、CHO細胞、TRG-2細胞、IMR-33細胞、Don細胞、G HK-21細胞、シトルリン血症細胞、Dempsey細胞、Detroit 551細胞、Detroit 510細胞、Detroit 525細胞、Detroit 529細胞、Detroit 532細胞、Detroit 539細胞、Detroit 548細胞、Detroit 573細胞、HEL 299細胞、IMR-90細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、WI-26細胞、MiCl₁細胞、CHO細胞、CV-1細胞、COS-1細胞、COS-3細胞、COS-7細胞、Vero細胞、DBS-FrhL-2細胞、BALB/3T3細胞、F9細胞、SV-T2細胞、M-MSV-BALB/3T3細胞、K-BALB細胞、BLO-11細胞、NOR-10細胞、C₃H/10T1/2細胞、

HS

DM₁ C₃細胞、KLN205細胞、McCoy細胞、マウスL細胞、Strain 2071 (マウスL)細胞、L-M株 (マウスL)細胞、L-MTK- (マウスL)細胞、NCTCクローン2472および2555、SCC-PSA1細胞、Swiss/3T3細胞、インドムンチャク (Indian muntjac)細胞、SIRC細胞、C₁₁細胞、およびJensen細胞、またはそれらの誘導体)。

細胞は、正常細胞であるか、または必要に応じて異常 (例えば、疾患のまたは遺伝子改変された) であり得る。白血病細胞株 (例えば、K562細胞、MOLT-4細胞、M1細胞など) のようなその他の哺乳動物細胞およびそれらの誘導体はまた、本発明の培地中での培養のために適切である。

293ヒト胚腎臓細胞およびHeLaS3細胞は、本発明の懸濁培地中での増殖のために特に好ましい。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NS/O細胞、およびハイブリドーマ細胞は、本発明の交換培地中での増殖のために特に好ましい。特に好ましいのはCHO細胞である。

細胞株およびハイブリドーマ株は当業者に周知である。例えば、ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 第7版, 1992 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) およびATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 第8版, 1996 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) を参照のこと。

動物に由来する、またはインビトロもしくはインビボにおいて当該分野において慣習的な方法を使用して構築された上皮組織、器官、および器官系は、本発明の培養培地中で同様に培養され得る。

細胞の単離

本発明の培地中での培養のための動物細胞は、商業的に、例えば、ATCC (Rockville, Maryland)、Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada)、またはInvitrogen (San Diego, California) から入手され得る。あるいは、細胞は、生検、剖検、提供(donation)、またはその他の外科手術的もしくは医学的手順を介して得られる動物組織のサンプルから直接単離され得る。

組織は、標準的滅菌技術および層流安全キャビネットを使用して取り扱われる

べきである。全てのヒト組織の使用および処理において、U.S. Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Preventionの勧告に従うべきである (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Richmond, J.Y.ら編, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 第3版(1993))。組織は、滅菌外科手術用器具を使用して小片 (例えば、 $0.5 \times 0.5\text{cm}$) に切断されるべきである。小片は、上記のように抗生物質を補充した滅菌生理食塩水溶液で2回洗浄されるべきであり、次いで必要に応じて、組織マトリックスからの細胞の解離を促進するために、酵素溶液 (例えば、コラゲナーゼまたはトリプシン溶液 (各々、例えば、Life Technologies, Inc., Rockville, Marylandから市販されている)) で処理され得る。

解離された細胞およびマトリックス分子の混合物は、適切な生理食塩水または組織培養培地 (例えば、カルシウムおよびマグネシウムを含まないダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水) で2回洗浄される。洗浄の間に、細胞は遠心分離され (例えば、 $200 \times g$ で)、次いで無血清組織培養培地中に懸濁される。アリコートは電子細胞計数機 (例えば、Coulter Counter) を使用して計数される。あるいは、細胞は血球計を使用して手動で計数され得る。

細胞の培養

単離された細胞および細胞株は、本発明者らによって決定された実験条件に従って培養され得る。以下の実施例は、機能的な少なくとも1組の、特定の哺乳動物細胞の培養のために有用である培養条件 (特に懸濁条件下での) を実証する。しかし、所定の動物細胞型のための最適なプレーティングおよび培養の条件は、慣習的な実験のみを使用して、当業者によって決定され得ることが理解されるべきである。本発明の培地を使用する慣習的な単層培養条件のために、細胞は、付着因子なしに培養容器の表面上にプレーティングされ得る。あるいは、容器は、天然の、組換えの、または合成の付着因子あるいはペプチドフラグメント (例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンなど、またはその天然の、もしくは合成のフラグメント) (これらは、例えば、Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland)、R&D Systems, Inc. (Rochester, Minnes

ota)、Genzyme (Cambridge, Massachusetts)、およびSigma (St. Louis, Missouri)

ri) から市販されている) で事前コートされ得る。単離された細胞はまた、天然のまたは合成の3次元支持体マトリックス (例えば、事前形成されたコラーゲンゲルまたは合成バイオポリマー物質) の中または上に播種され得る。懸濁培養のために、細胞は代表的には、本発明の培養培地中に懸濁され、そして懸濁物中の細胞の培養を促進する培養容器 (例えば、スピナーフラスコ、環流装置、またはバイオリアクター) 中に導入される (Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, New York: Alan R. Liss, Inc. 123-125頁(1983)を参照のこと)。理想的には、培地および懸濁細胞の攪拌は、培養の間の培地成分の変性および細胞の剪断を回避するために最小にされる。

各々の実験条件についての細胞播種濃度は、使用される特定の培養条件について最適化され得る。プラスチック培養容器中での慣習的な単層培養物のために、 $1 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/cm² の開始播種密度が好ましく、一方懸濁培養のためには、より高い播種密度 (例えば、 $5 \sim 20 \times 10^5$ 細胞/cm²) が使用され得る。

哺乳動物細胞は代表的には、約37℃の細胞インキュベーター中で培養される。インキュベーターの雰囲気は、加湿されるべきであり、そして空気中約3~10%の二酸化炭素、より好ましくは空気中約8~10%の二酸化炭素、および最も好ましくは空気中約8%の二酸化炭素を含むべきであるが、特定の細胞株の培養は、最適の結果のために空気中20%ほどの高い二酸化炭素を必要とし得る。培養培地のpHは、約7.1~7.6、好ましくは約7.1~7.4、および最も好ましくは約7.1~7.3の範囲であるべきである。

閉鎖またはバッチ培養物中の細胞は、細胞が約 $1.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/mlの密度に達すると、完全な培地交換 (すなわち、消費された培地の新鮮な培地での置換) を経るべきである。環流培養物中 (例えば、バイオリアクターまたはファーマンター中) の細胞は、連続的な循環で新鮮な培地を受ける。

ウイルス産生

懸濁物または単層培養物中での哺乳動物細胞の培養に加えて、本発明の培地は

、哺乳動物細胞からウイルスを産生するための方法において使用され得る。本発明のこの局面によるそのような方法は、(a) ウイルスで感染されるべき哺乳動物

細胞を得る工程；(b) ウイルスによる細胞の感染を促進するために適切な条件下で細胞をウイルスと接触させる工程；および(c) 細胞によるウイルスの産生を促進するために適切な条件下で本発明の培養培地中で細胞を培養する工程を包含する。本発明によれば、細胞は、本発明の培養培地中での細胞の培養の前、間、または後のいずれかにウイルスと接触させられ得る；ウイルスで哺乳動物細胞を感染させるための最適な方法は当該分野において周知であり、そして当業者によく知られる。本発明の培地中の懸濁物中で培養されるウイルス感染哺乳動物細胞は、本発明の培地中の懸濁物中で培養されないウイルス感染哺乳動物細胞より、高いウイルス力価（例えば、2、3、5、10、20、25、50、100、250、または1000倍高い力価）を産生することが予想され得る。これらの方法は、種々の哺乳動物ウイルスおよびウイルスベクター（アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスなどを含むがそれらに限定されない）を産生するために使用され得、そして最も好ましくはアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを産生するために使用される。本発明の培地中での感染細胞の培養後、ウイルス、ウイルスベクター、ウイルス粒子、あるいはその成分（タンパク質ならびに／または核酸（DNAおよび／もしくはRNA））を含む使用された培養培地は、種々の目的（ワクチン産生、細胞トランスフェクションまたは遺伝子治療における使用のためのウイルスベクターの産生、動物または細胞培養物の感染、ウイルスタンパク質および／または核酸の研究などを含む）のために使用され得る。あるいは、ウイルス、ウイルスベクター、ウイルス粒子、またはその成分は、必要に応じて、タンパク質および／または核酸の単離のための技術（これは、当業者に良く知られる）に従って、使用された培養培地から単離され得る。

組換えタンパク質産生

本発明の培養培地はまた、哺乳動物細胞からの、特に懸濁物中で増殖させられた哺乳動物細胞からの、組換えタンパク質の産生のための方法において使用され

得る。組換えタンパク質産生のために一般に使用される細胞株（例えば、CHO細胞）は、代表的には、異常にグリコシル化されているタンパク質を産生する（La o, M. -S. ら、Cytotechnol. 22:43-52(1996); Graner, M. J. ら、Biotechnol. 1

3:692-698(1993); Graner, M. J., および Goochee, C. F., Biotechnol. Prog. 9:366-373(1993))。しかし、本発明の方法によって提供されるような、中性pHにおける293細胞中の比較的低い β ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼ活性は、その天然の対応物により近く類似する組換えタンパク質の産生を促進し得る（Graner, M. J., および Goochee, C. F., Biotechnol. Bioeng. 43:423-428(1994))。さらに、本発明の培養培地は哺乳動物細胞の迅速な高密度懸濁培養を提供するので、本発明の方法は、以前に可能であったよりも高い濃度での組換えタンパク質の迅速な産生を促進する。

本発明によるポリペプチドを産生する方法は、(a) ポリペプチドを産生するように遺伝子操作されている哺乳動物細胞を得る工程；および (b) 哺乳動物細胞によるポリペプチドの発現に好ましい条件下で本発明の培養培地中で哺乳動物細胞を培養する工程を包含する。目的のポリペプチドを発現するように哺乳動物細胞を遺伝子操作するための最適の方法は、当該分野において周知であり、それゆえ当業者によく知られる。細胞は、本発明の培地中での培養の前に遺伝子操作され得るか、またはそれらは培地中の培養物中に入れられた後に1つ以上の外因性核酸分子でトランスフェクトされ得る。本発明によれば、遺伝子操作された細胞は、単層培養物中で、またはより好ましくは懸濁培養物としてのいずれかで、上記の方法に従って、本発明の培養培地中で培養され得る。細胞の培養後、目的のポリペプチドは、必要に応じて、タンパク質単離の技術（これは、当業者に良く知られる）に従って細胞および／または使用された培養培地から精製され得る。

本明細書中に記載される方法および適用に対する他の適切な改変および適合が明らかであり、そしてそれが本発明の範囲またはその任意の実施態様から逸脱することなくなされ得ることは、関連する分野の当業者に容易に明らかとなる。今や本発明を詳細に記載し、同じことは以下の実施例を参照してより明らかに理解

される。この実施例は、例示の目的のみのために本明細書に含まれており、そして本発明を限定することは意図されない。

実施例

材料および方法

以下の実施例の各々において、以下の材料および方法を一般に使用した。

他に示さない限り、全ての培地および試薬を、Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland) から入手した。

懸濁培地実施例

アデノウイルス5型トランスフォーム293ヒト胚腎臓上皮細胞をATCC (CRL 1573) から入手し、そしてこれを実施例4に記載のように、8%CO₂/92%空気からなる加湿雰囲気中での37℃でのインキュベーションによって培養した。

交換培地実施例

A. 培地

CHO-S-SFM II (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) は、懸濁培養物中のCHO細胞による増殖および組換えタンパク質発現のために設計された低タンパク質 (<100 μg/ml) 無血清培地である。CHO-S-SFM-IIは、インスリンおよびトランスフェリンの両方を含有する。

CHO III Prototypeは、動物由来タンパク質を含まず、そして懸濁培養物中での増殖および組換えタンパク質発現のために設計された本質的にタンパク質を含まない処方物である。用語「CHO III Prototype」、「CHO III PFM」、および「CHO III」は同義である。

CD CHOは、本発明の交換培地の特に好ましい実施態様であり（表1、特に好ましい実施態様の欄）、これにはFe²⁺ および/またはFe³⁺ キレートが添加されており、そしてこれは懸濁培養適用のために設計された科学的に規定された処方物である。適用可能である場合、グルタミンもまた添加される。

3つ全ての上記の培地を、DHFR増幅rCHO培養物のためのヒポキサンチンおよびチミジンなしで処方した。

B. CHO細胞

野生型CHODG44細胞をLawrence Chasin博士 (Columbia University) から入手し、そしてこれをヒポキサンチンおよびチミジンを補充したCHO-S-SFM II中での懸濁培養物に適合させた。細胞をCHO-S-SFM II+HT SupplementまたはCHO IIIPrototype (Life Technologies, Inc.) 中で維持した。

組換えウシ成長ホルモン (rbGH) CHO細胞株を樹立するために、野生型CHO-K1

細胞を2つのプラスミド：pRSVneo (ネオマイシン耐性遺伝子を含む) およびbGHカセットで、LipofectAMINETM 試薬 (Life Technologies) とともに供給されるプロトコルを使用してトランスフェクトした。選択を、ネオマイシンアナログであるG418 (1.2mg/mlの濃度) の存在下で実施した。rCHO細胞のストック培養物を、0.6mg/ml G418を補充したCHO-S-SFM IIまたはCHO III Prototypeのいずれかの中で維持した (全て、Life Technologies, Inc. の製品)。

組換え β ガラクトシダーゼ (r β -Gal) CHO細胞株を樹立するために、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損 (DHFR) CHO細胞をATCC (CRL-9096, Rockville, MD) から入手し、そして2つのプラスミド：pSV2dhfr(ATCC 37146) (メトトレキセート (MTX) 耐性のための遺伝子を含む) およびpCMV β gal (これは、LacZ cDNAを含む) を用いてトランスフェクトした。トランスフェクションをLipofectAMINETM 試薬を使用して実施し、そして選択を1.2 μ Mメトトレキセート (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) を用いて達成した。ストック培養物を、0.3 μ M MTXを補充したCHO-S-SFM IIまたはCHO III Prototype中で維持した。

c. アッセイ

1. ELISAによる組換えbGHの定量

rbGH産生を、製造業者の説明書に従ってNon-Isotopic Immunoassay System for rbGH Transfection ProteinTM (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) を使用して定量した。

2. r β -Galアッセイ

r β ガラクトシダーゼ (r β -galまたはr β eta-Gal) を、Hallら、J. Mol. Appl. Gen. 2:101-109(1983)およびMiller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory(1972)によって記載される方法の改変を使用して

、細胞溶解物において測定した。簡潔に記載すると、細胞懸濁物の2.0mlのサンプルを各々のサンプルから採集し、そして2回の凍結融解サイクルに供し、100×gで4分間遠心分離し、そして上清を α -ガラクトシダーゼ定量のために貯蔵した。100 μ lの各々の上清サンプルを1.0mlのZ緩衝液 (0.06M Na_2HPO_4 、0.04M NaH_2PO_4 、0.01M KCl, 0.01M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05M β -メルカプトエタノール (pH7.0)) に添加し、続いて200 μ lのo-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド (ONPG、d

H_2O 中4.0mg/ml) を添加し、そして37℃で120分間インキュベートした。反応を、500 μ l停止緩衝液(1M Na_2CO_3)の添加によって停止し、そして420nmにおける吸光度を、適切な培地のブランクに対して読み取った。活性を以下の式を使用して算出した：

$$1. \frac{1000 \times A_{420}}{120 \text{分} \times 0.1 \text{ml}} = \alpha \text{ ガラクトシダーゼ単位}$$

2. α ガラクトシダーゼ単位/細胞数=活性/細胞

α ガラクトシダーゼを、細胞において、Sanesら、EMBO J. 5:3133-3142 (1986)の染色方法を使用して検出した。

3. アミノ酸、アンモニア、グルコース、および乳酸測定

培養上清中のアミノ酸およびアンモニアのレベルを、Waters AccQ-Tag法 (Millipore Corp., Milford, PA) を使用するHPLCによって測定した。グルコースおよび乳酸濃度を、YSI Select Biochemistry Analyzer (Model 2700, YSI, Yellow Spring, OH) を用いて決定した。

D. CHO細胞培養

以下に他に示さない限り、CHO細胞の培養条件は、以下の実施例について以下のとおりであった。25～35mLのCHO細胞を125mL振とうフラスコ中で、5～10%二酸化炭素を含む加湿空気中で培養した。振とうフラスコを、軌道振とうプラットフォーム (orbital shaking platform) 上で125～135rpmで振とうした。温度を37℃に維持した。細胞を3～4日毎に $2 \sim 3 \times 10^5$ 細胞/mLの密度まで継代培養した。

実施例 1

完全懸濁培地の処方

基本細胞培養培地の処方。基本細胞培養培地を処方するために、以下を粉末として混合した：L-アルギニン・HCl (430.00mg/L；355.6mg/LL-アルギニン遊

離塩基)、L-アスパラギン(無水) (26.40mg/L)、L-アスパラギン酸 (75.00mg/L)、L-システイン (57.6mg/L)、L-グルタミン酸 (29.40mg/L)、L-グルタミン (585.00mg/L)、L-ヒスチジン (42.15mg/L)、L-イソロイシン (190.00mg/L)、L-ロイシン (280.00mg/L)、L-リジン (204mg/L)、L-メチオニン (115.00mg/L)、L-フェニルアラニン (70.00mg/L)、L-セリン (250.00mg/L)、L-スレオニン (60.00mg/L)、L-トリプトファン (20.00mg/L)、L-チロシン (69.2mg/L)、L-バリン (190.00mg/L)、ビオチン (0.097mg/L)、D-Ca⁺⁺-パントテン酸 (1.19mg/L)、塩化コリン (14.00mg/L)、葉酸 (5.00mg/L)、1-イノシトール (18.00mg/L)、ナイアシンアミド (1.22mg/L)、ピリドキシン・HCl (1.03mg/L；0.85mg/Lピリドキシン遊離塩基)、リボフラビン (0.22mg/L)、チアミン (0.99mg/L)、ビタミンB₁₂ (1.03mg/L)、プトレッシン (0.087mg/L)、D-グルコース (4500.00mg/L)、KCl (276.30mg/L)、NaCl (4410.00mg/L)、HEPES (2980.00mg/L)、リノール酸 (0.06mg/L)、D,L-リボ酸 (2.00mg/L)、フェノールレッド (1.00mg/L)、PLURONICF68 (300.00mg/L)、ピルビン酸ナトリウム (110.00mg/L)、Na₂HPO₄ (125.00mg/L)、インスリン(亜鉛ヒト組換え) (10.00mg/L)、トランスフェリン(ヒトホロ、熱処理) (5.00mg/L)、エタノールアミン・HCl (5mg/L；3.2mg/Lエタノールアミン)、Fe(NO₃)₃・9H₂O (0.810mg/L)、MgCl₂ (76.20mg/L)、MgSO₄ (24.10mg/L)、CaCl₂ (11.10mg/L)、ZnSO₄・H₂O (0.0874mg/L)、Na₂SeO₃ (0.0000067mg/L)、MnCl₂ (0.0001mg/L)、およびNH₄VO₃ (0.0006mg/L)。

NaHCO₃ (2400.00mg/L)を培地溶液に添加し、次いで溶液のpHをHClで7.2±0.05に調整し、そして容量をddH₂Oで完全な所望される容量に調整した。浸透圧を265~275mOsmであると決定した。

完全培養培地に処方するために、100mg/L硫酸デキストラン(平均分子量=5,000ダルトン)を基本培地に添加し、そして完全培地を低タンパク質結合フィル

ターを通して濾過し、そして直ちに使用するかまたは使用まで4℃で減光条件下で貯蔵した。

実施例2

低タンパク質およびタンパク質非含有培養培地の処方

タンパク質がより低い培養培地を産生するために、基本培地を、トランスフェリンを処方から省略した以外、実施例1に記載のように処方した。トランスフェリンの代わりに、40 μ M FeSO₄-EDTA(Sigma; St. Louis, Missouri)または60 μ M FeCl₃-クエン酸ナトリウム (Sigma) のいずれかを基本培地に添加し、次いでこの低タンパク質培地を、実施例1に記載のように、濾過および貯蔵した。

完全にタンパク質を含まない培養培地を処方するために、トランスフェリンを含まない低タンパク質培地を、インスリンもまた処方から省略し、代わりにインスリンの代用品としてZnSO₄の最終濃度を0.354mg/Lに増加した以外、上記のように産生した。次いで、タンパク質非含有培養培地を、実施例1に記載のように、濾過および貯蔵した。

実施例3

培養培地の富化

より富化された培養培地を提供するために、上記の基本培地および/または完全培地にさらなる成分を補充した。1つのそのような富化（動物タンパク質が低い（または動物タンパク質を含まない）培養培地を生じる）において、加水分解イネペプチドの処方物（Hy-Pep Rice Extract; Quest International, Norwich, New York）を、実施例1または実施例2（動物タンパク質非含有培地について）の完全培地に、約100mg/Lの濃度（約1～1000mg/Lの濃度もお受容可能であることが見出された）で添加した。次いで富化培養培地を、実施例に記載のように、滅菌濾過し、そして使用まで貯蔵した。動物タンパク質を含まない富化培養培地を提供する別の処方物において、ダイズペプチドの処方物（Hy-Soy; Quest International）を同様の濃度で添加した。

その他の富化培養培地を、1つ以上のサイトカイン（例えば、増殖因子）を以下の最適濃度で添加することによって調製する：EGF（約0.00001～10mg/L）、a

FGFまたはbFGF (約0.0001~10mg/L)、KGF (約0.0001~10mg/L)、またはHGF (約0.00001~10mg/L)。その他のサイトカインをまた、必要に応じて、慣習的実験 (例えば、用量応答曲線) によって容易に最適化される濃度で添加する。サ

イトカインは、例えばLife Technologies, Inc. (Rockville, Maryland) から市販されている。

その他の富化培養培地を、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HSA)、またはカゼインのような1つ以上の動物ペプチドを添加することによって調製する。動物ペプチドは、例えばSigma (St. Louis, Missouri) から市販されており、そしてこれを基本培地または完全培地に約1~30,000mg/Lの濃度範囲で添加する；特定の適用のための最適濃度は、慣習的実験によって容易に決定される。

その他の富化培養培地を、1つ以上の酵母ペプチド (例えば、酵母エキス、イーストレート (yeastolate)、または酵母エキス限外濾過物 (yeast extract ultrafiltrate)) を添加することによって調製する。酵母エキスおよびイーストレートは、例えばDifco (Norwell, Massachusetts) から市販されており、一方酵母エキス限外濾過物は、米国出願第60/028,197号 (1996年10月10日出願) (その開示はその全体が参考として本明細書に援用される) に記載のように調製される。酵母ペプチドを基本培地または完全培地に約1~30,000mg/Lの濃度範囲で添加する；特定の適用のための最適濃度は、慣習的実験によって容易に決定される。

調製後、富化培養培地を、完全培地について実施例1に記載するように滅菌濾過および貯蔵する。

実施例4

上皮細胞の懸濁培養のための培養培地の使用

足場依存細胞の懸濁培養における本発明の培地の効力を示すために、5型アデノウイルスDNAで形質転換した293ヒト胚腎臓細胞を培養した。血清を補充した培地中の293細胞の培養物を、165cm² 培養フラスコ中で2%正常ウマ血清を補充したOptiMEM培地 (Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland) 中で2~3回

継代することにより、血清から分離した。2または3回目の継代の後、細胞が50～75%コンフルエンスに達したときに、フラスコを数回軽く叩くことによって、それらを増殖表面から引き離した；トリプシンまたは他のタンパク質分解剤は使

用しなかった。なぜなら、このような薬剤は、しばしば低血清または無血清培地で培養した細胞に不可逆的な損傷を引き起こすからである。細胞を本発明の培養培地中に再懸濁し、そして凝集体が単細胞の懸濁物に分散するまで粉碎し、そして細胞濃度および生存度を、日常的な手順に従って、血球計でトリパンブルー排除計数 (exclusion counting) によって決定した。

次いで、細胞を、三角フラスコ中の本発明の培養培地中に、約 $2.5 \sim 3.0 \times 10^5$ 細胞/mlの密度で播種した。細胞の凝集を最小にするために、培養フラスコ中の播種容量を、フラスコの総容量の約20%未満に維持した（例えば、125mlのフラスコについて、細胞の希釈後の総容量は、約21～22mlを超えなかった；250mlのフラスコについては、約40～45mlを超えなかった）。次いで、細胞を懸濁液として維持するために、フラスコをインキュベーター中（37℃、8 %CO₂/92%大気）の回転式振盪合の上に置き、そして125rpmで振盪した。細胞密度および生存度を、少なくとも1日おきに測定し、そして細胞を、その密度が新鮮な培養培地での培養物の希釈により約 $7.5 \sim 10.0 \times 10^5$ 細胞/mlに達したときに、約 $2.5 \sim 3.0 \times 10^5$ 細胞/mlの密度になるように継代した。継代培養を、培養中の細胞の凝集が最小に見えるまで継続した。

一旦、細胞を本発明の培養培地中の懸濁液中での培養に適合させると、培養物をより大きな容量のスピナーフラスコか、またはバイオリアクター中にスケールアップした。細胞を、フラスコ培養物から、約400gでの5分間の遠心分離によって濃縮し、ペレットを本発明の培地中で穏やかに分散し、その後45秒間ボルテックスで混合することによって再懸濁し、そして約 $2.5 \sim 3.0 \times 10^5$ 細胞/mlの密度で、スピナーフラスコまたはバイオリアクター中の本発明の培地中に細胞を播種した。細胞を懸濁液として維持しつつ細胞の剪断を最小にするために、スピナー培養物についてはスピナーの速度を約150rpmに設定し、一方バイオリアクター培養物については、羽根車の速度を約70rpmに設定した。

三角フラスコの293細胞の培養物において、約 $2.5 \sim 3.0 \times 10^6$ 細胞/mlの生存細胞密度を得た（データ示さず）。図1に示すように、ほぼ100%生存度を有する $3.5 \sim 4.0 \times 10^5$ /mlまでの細胞密度を、本発明の完全培地中の293細胞のバイオリクターおよびスピナー培養物において、培養の開始後2～3日に得た。類似の結果を、

HeLaS3子宮頸部上皮細胞の懸濁培養物で得た（示さず）。本発明の低タンパク質培養培地（そこで、トランスフェリンは、 FeSO_4 -EDTAまたは FeCl_3 クエン酸ナトリウムキレート剤のいずれかで置換されていた）は、293細胞の増殖を支持することにおいて、完全培地と同等に機能した（図2）。

まとめると、これらの結果は、本発明の培養培地が、無血清、低タンパク質、または無タンパク質環境で、足場依存性上皮細胞および293細胞の高密度懸濁培養を促進することを示す。

実施例 5

293細胞の懸濁培養によるウイルスの産生

ウイルス産生プロトコルにおける本発明の培地の有用性を試験するために、293細胞の懸濁培養物を実施例4に記載するように調製し、そしてアデノウイルスで感染させた。細胞の感染を、懸濁培養中で、約5～50のMOIでアデノウイルスを添加することによって直接行い、次いで培養物を、約48～96時間、実施例4におけると同様に維持した。次いで、アデノウイルスを培養培地で回収し、そして許容宿主細胞株A549に対して力価測定した。

図3に示すように、本発明の培地中で培養したアデノウイルス感染293細胞は、感染後約2日目で始まって、4日目まで続いた高力価のアデノウイルス5を産生した。これらの結果は、本発明の培養培地が、293細胞の懸濁培養物中で、活性なウイルス（例えば、アデノウイルス）の迅速な大スケールの産生を促進することを示す。

実施例 6

293細胞の懸濁培養による外来遺伝子の発現

組換えポリペプチドの産生を促進することにおける、本発明の培地の有用性もまた試験した。293細胞株を、6ウェル培養プレート中の10%FBSを含有するRPMI

-1640 (増殖培地) 中に 3×10^5 細胞/ml でプレートし、そして1日後、 $1.5 \mu\text{g}$ の pCMV・SPORT- β -ガラクトシダーゼおよび $0.5 \mu\text{g}$ の pSV2neo プラスミド DNA (LTI; Rockville, Maryland) で、 $12 \mu\text{l}$ の LipofectAMINE (LTI) の存在下で、標準的な L

i
pofectAMINE プロトコルを使用してトランスフェクトした。トランスフェクション後24時間で、各ウェル中の細胞を、 10cm^2 プレート中の増殖培地中に最終希釈1:50、1:200、および1:500で継代培養し、そしてトランスフェクション後48時間で、増殖培地を選択培地 ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$ のジェネテシン (genetecin) (LTI) を含有する増殖培地) で置換した。培地を必要に応じて変えて、非生存細胞を除去し、そして耐性クローンをクローニングシリンダーで選択し、そして懸濁培養に適用するために24ウェルプレートに移した。

β ガラクトシダーゼを発現するクローンを、本発明の培養培地での懸濁物培養物に、実施例4に詳細に記載する手順に従って適用した。全ての培養物について、細胞に対する選択的圧力を維持するために、ジェネテシンを本発明の培養培地に、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度で含ませた。より高い濃度のジェネテシンは推奨されない。なぜなら、それは本発明の培地のような無血清、低タンパク質培地において毒性であり得るからである。

図4に示すように、 β ガラクトシダーゼの有意な量を、トランスフェクション後1日目で開始し、そして6日間にわたる培養を通じて継続して本発明の培地中で培養したトランスフェクトした293細胞によって産生した。これらの結果は、本発明の培養培地が、外来遺伝子での上皮細胞の安定なトランスフェクション、および293細胞の懸濁培養による組換えポリペプチドの迅速な大スケールの産生を促進することを示す。

実施例7

r β -gal CHO細胞を、 3×10^5 細胞/ml で、CHO-S-SFM II 培地 (ヒポキサンチンおよびチミジンを含まない)、CDCHO 培地、またはCHOI II プロトタイプ培地に置いた。サンプルを、種々の時点で、細胞密度および β ガラクトシダーゼ発現レベルの決定のために保存した。図5Aに示すように、最も高い細胞密度をCD CHO 培地

で得た。これは、本発明の培地である。培養4日目に、最も高いレベルの β ガラクトシダーゼ発現を、CHO III培地で観察した(図5B)。培養の6日目までに、CHO III培地で増殖させた細胞中の β ガラクトシダーゼ発現のレベルは低下したが、本発明の交換培地(CD CHO培地)で増殖させた細胞中の β ガラクトシダーゼ

発現のレベルは増大した。実際、CD CHO培地で増殖させた細胞中の β ガラクトシダーゼ発現のレベルは、培養の7日目に増加し続けた。

実施例8

r β -gal CHO細胞を、 2×10^5 細胞/mlで、CHO-S-SFM II培地(ヒポキサンチンおよびチミジンを含まない)、CD CHO培地、またはCHO III培地のいずれかに置いて置いた。置いた後3日にて、CD CHO培養物が、約 1.2×10^6 細胞/mlに達したときに、CD CHO培養物を遠心分離し、そして新鮮なCD CHOまたはCHO III培地中に再懸濁した。8日目までに、CHO III培地に替えたCD CHO培養物は、CD CHO培地中に維持した培養物よりも低いピーク細胞密度に達した(図6A)。

培養の7日目に、本発明の交換培地(CD CHO培地)中で増殖させた細胞中でのr β ガラクトシダーゼ発現のレベルは、CHO III培地に替えた細胞でのレベルに匹敵した(図6B)。

実施例9

r β -gal CHO細胞を、 1.8×10^5 細胞/mlで、漸増濃度のメトトレキセート(MTX)で補充したCD CHO培地に置いた。示した濃度は、最終濃度である。サンプルを、細胞密度およびr β ガラクトシダーゼ発現の決定のために毎日採取した。MTX濃度は、細胞密度に対して反比例したが(図7A)、MTX濃度は、r β ガラクトシダーゼ比活性に対して正比例した(図7B)。従って、本発明の培地は、メトトレキセートで補充した場合には、高レベルの組換えタンパク質を発現する組換えDHFR増幅CHO細胞を増殖させるために使用され得る。本発明の培地は、タンパク質を含まないので、組換えタンパク質生成物を容易に精製し得る。

実施例10

rbGH CHO細胞を、 2×10^5 /mlで、125mlの振盪フラスコ(35ml容量)中の、CHO III培地か、またはCD CHO培地のいずれかに置いた。サンプルを、生存細胞密度

およびrbGHレベルの決定のために毎日採取した。CD CHO培養物は、より高いピーク細胞密度に達し(図8A)、そしてより高いレベルのrbGHを発現した(図8B)。

実施例11

rβ-gal CHO細胞を、 3×10^5 /mlで、125mlの振盪フラスコ(20~35ml容量)中の、CHO-S-SFM II培地またはCD CHO培地のいずれかに置いた。サンプルを、生存細胞密度およびrβ-galレベルの決定のために毎日採取した。総細胞密度は、CD CHO培養物において上昇し続けたが(3~8日、図9A)、総細胞密度は、CHO-S-SFM II培養物中で一定のままであった。rβ-galレベルは、両方の培養条件下で上昇し続けたが、CD CHO培養物は、より多い総rβ-gal生成物を発現した(図9B)。従って、インスリンおよびトランスフェリンと含有する培地に比較して、本発明の培地は、細胞増殖およびタンパク質発現のレベルの増大を補助する。

実施例12

rβ-gal CHO細胞を、 3×10^5 /mlで、125mlの振盪フラスコ(20~35ml容量)中の、CD CHO、CHO III PFM、またはFMX-8培地に置いた。FMX-8培地は、Zang, Mら、Bio/Technology 13 389-392(1995)に開示されている。

図10に示されるように、培養の7日後に、CHO III PFM培地中で増殖させた細胞は、FMX-8培地中で増殖させた細胞の約2倍の密度まで増殖した。図10に示すように、CD CHO培地で増殖させた細胞は、CD CHO培地で増殖させた細胞の密度の約3倍の密度まで、そしてFMX-8培地中で増殖させた細胞の密度の約6倍まで増殖した。

図11に示すように、CHO III PFM培地中で増殖させた細胞は、rβ-galを、FMX-8培地で増殖させた細胞のレベルの約3倍のレベルで発現した。図11に示すように、CD CHO培地で増殖させた細胞は、CD CHO培地中で増殖させた細胞のレベルの約1.6倍、そしてFMX-8培地で増殖させた細胞のレベルの約5倍のレベルで、rβ-galを発現した。従って、FMX-8培地に比較して、本発明の培地は、細胞増殖およびタンパク質発現のレベルの増大を補助する。

実施例13

CD CHO培地は、啮乳動物細胞のスケールアップ培養もまた補助する。rβ-gal

CHO細胞を、250mlの振盪フラスコ（75mlの作業容量）中のCD CHO培地中に $1 \sim 3 \times 10^5$ /mlで置き、そしてpH7.40、50%大気飽和、37℃で、125～135r.p.m.で振盪しながら培養した。バイオリアクター実験のために、 $r\beta$ -gal細胞を $1 \sim 3 \times 10^5$ /mlで、5 Lの攪拌タンクCelligenバイオリアクター（3.8Lの作業容量）中のCD CHO培地中に置き、そしてpH7.40、50%大気飽和、37℃で、90r.p.m.で振盪しながら培養した。矢印は、培養9日目で、3 g/Lのグルコース（最終濃度）および1 g/Lのグルタミン（最終濃度）を補充したことを示す。

図12Aに示すように、バイオリアクター中で培養したrCHO細胞の増殖の速度論は、振盪フラスコ中で観察したものと類似であった。図12Bに示すように、 $r\beta$ -gal発現のレベルは、バイオリアクター中で培養した細胞においてより高かった。グルコースおよびグルタミンでの補充は、9日目に達したレベルを超えては細胞増殖を増大しなかった。これらの結果は、CD CHO培地が、スケールアップ細胞培養において首尾良く使用され得ることを示す。

実施例14

抗凝集剤であるデキストラン硫酸の細胞増殖およびタンパク質発現に対する効果を決定するために、組換え細胞を、デキストラン硫酸（5,000または500,000のいずれかの分子量）の存在下または非存在下で培養した。 $r\beta$ -gal CHO細胞を、 3×10^5 /mlで、125mlの振盪フラスコ（20～35ml容量）中のCD CHO培地に置いた。デキストラン硫酸を、細胞を置く時点で、最終濃度25 μ g/mlまで培地に添加した。結果を図13および図14に示す。図13および14において、「A」がデキストラン硫酸（分子量5,000）であり、そして「C」がデキストラン硫酸（分子量500,000）である。CD CHOコントロール細胞は、デキストラン硫酸が添加されなかった細胞である。図13に示すように、デキストラン硫酸（分子量5,000）を含有する細胞増殖培地は、5、7、および9日目に細胞増殖および生存度の増大を示した。図13に示すように、デキストラン硫酸（分子量500,000）中で増殖させた細胞は、5および7日目に細胞増殖および生存度の増大を示したが、9日目には示さなかった。図14に示すように、デキストラン硫酸（分子量5,000）中で増殖させた細胞は、5、7、および9日目に、 $r\beta$ -gal発現のレベルの増大を示した。

図14に

示すように、デキストラン硫酸（分子量500,000）を補充した培地中で増殖させた細胞は、増強された発現を示さなかった。

ここで、理解の明確さの目的のために、図解および例示によりいくらか詳細に本発明を完全には記載しているので、同一のものが、条件、処方物、および他のパラメーターの広範および同等の範囲内で本発明を改変または変更することによって、本発明、またはその任意の特定の実施態様の範囲に影響を与えることなく実施され得ること、ならびにこのような改変または変更が、添付の請求の範囲の範囲内に含まれることが意図されることが当業者には明らかである。

本明細書中で言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、本発明が属する分野の当業者の技術レベルの指標であり、そして個々の刊行物、特許、または特許出願の各々が、参考として援用されることが特別に、そして個々に示されているかのように、同じ程度まで本明細書中で参考として援用される。

【図1】

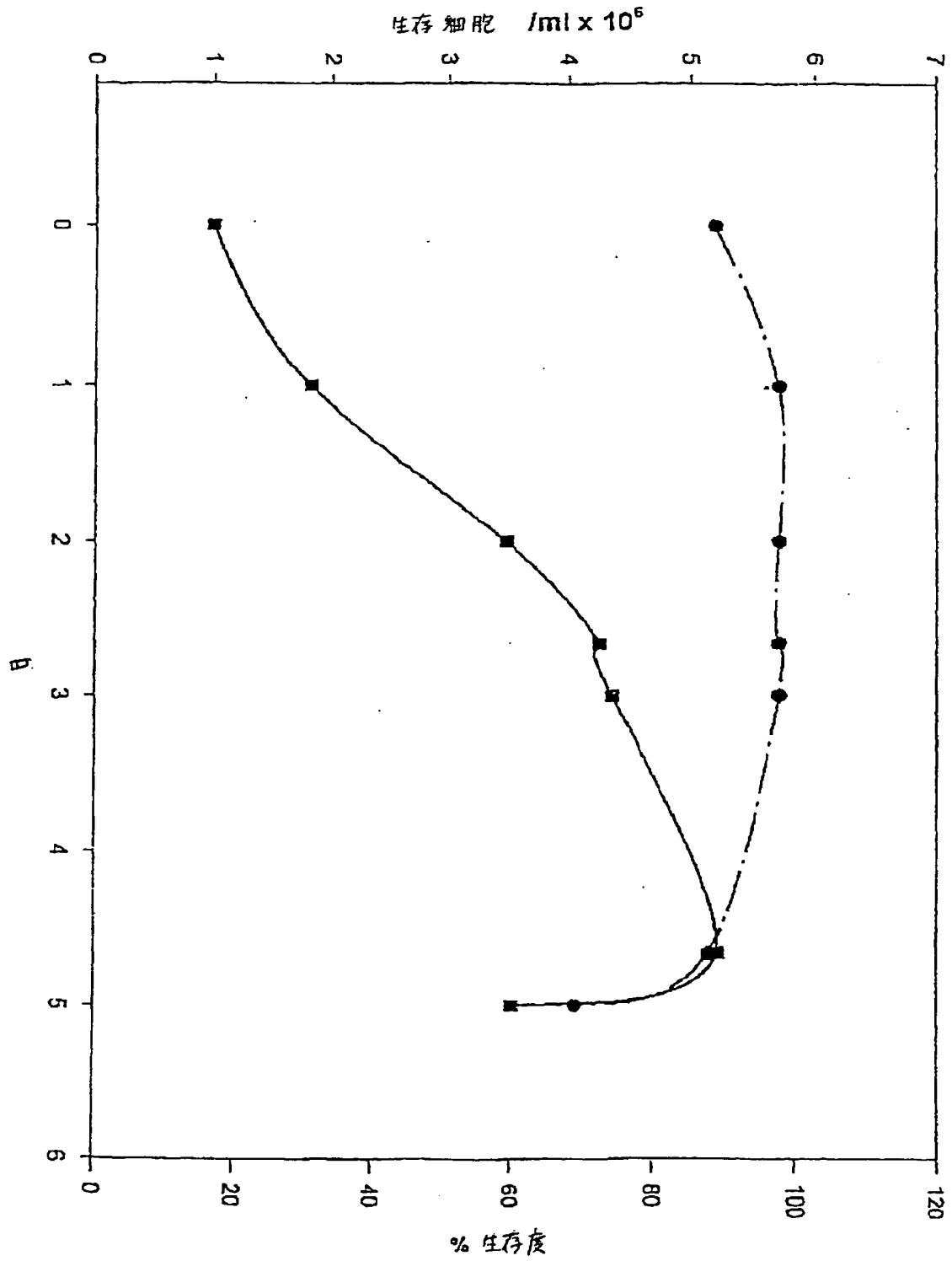


Figure 1

【図2】

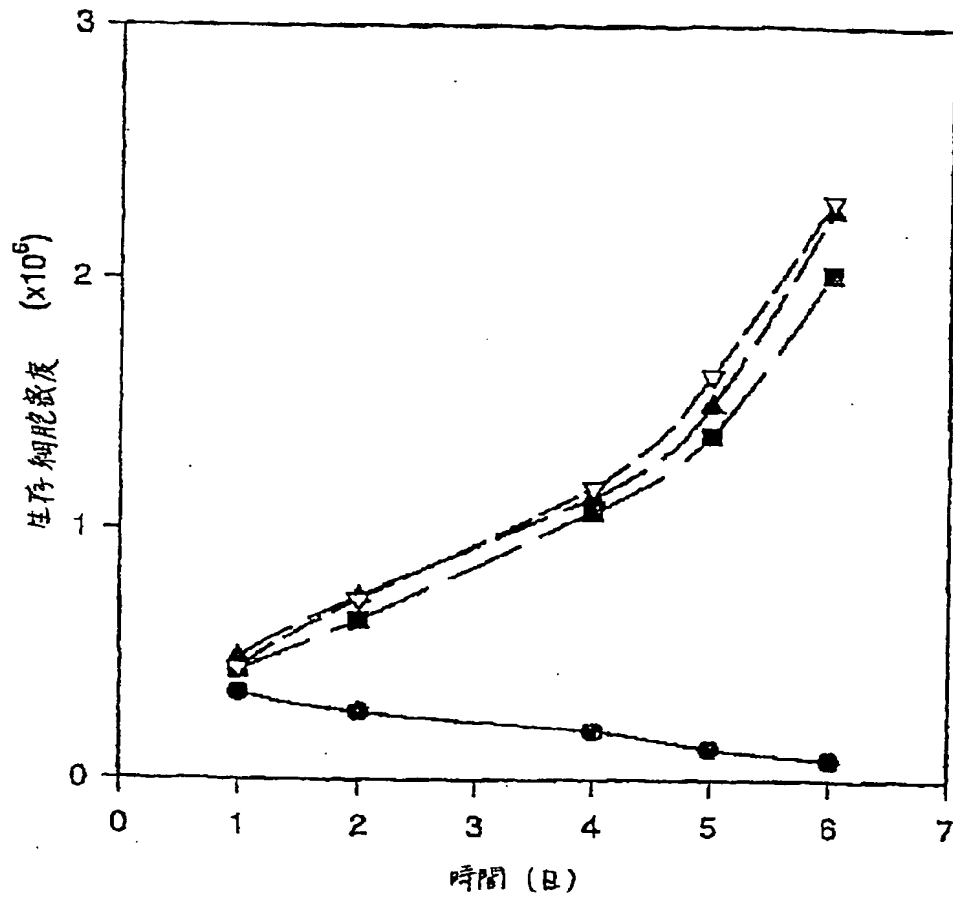


FIGURE 2

【図3】

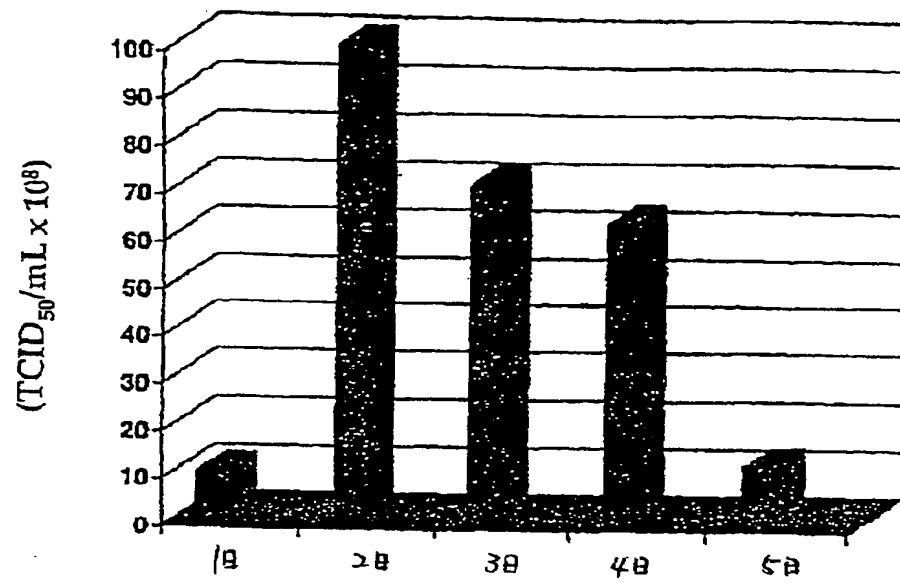
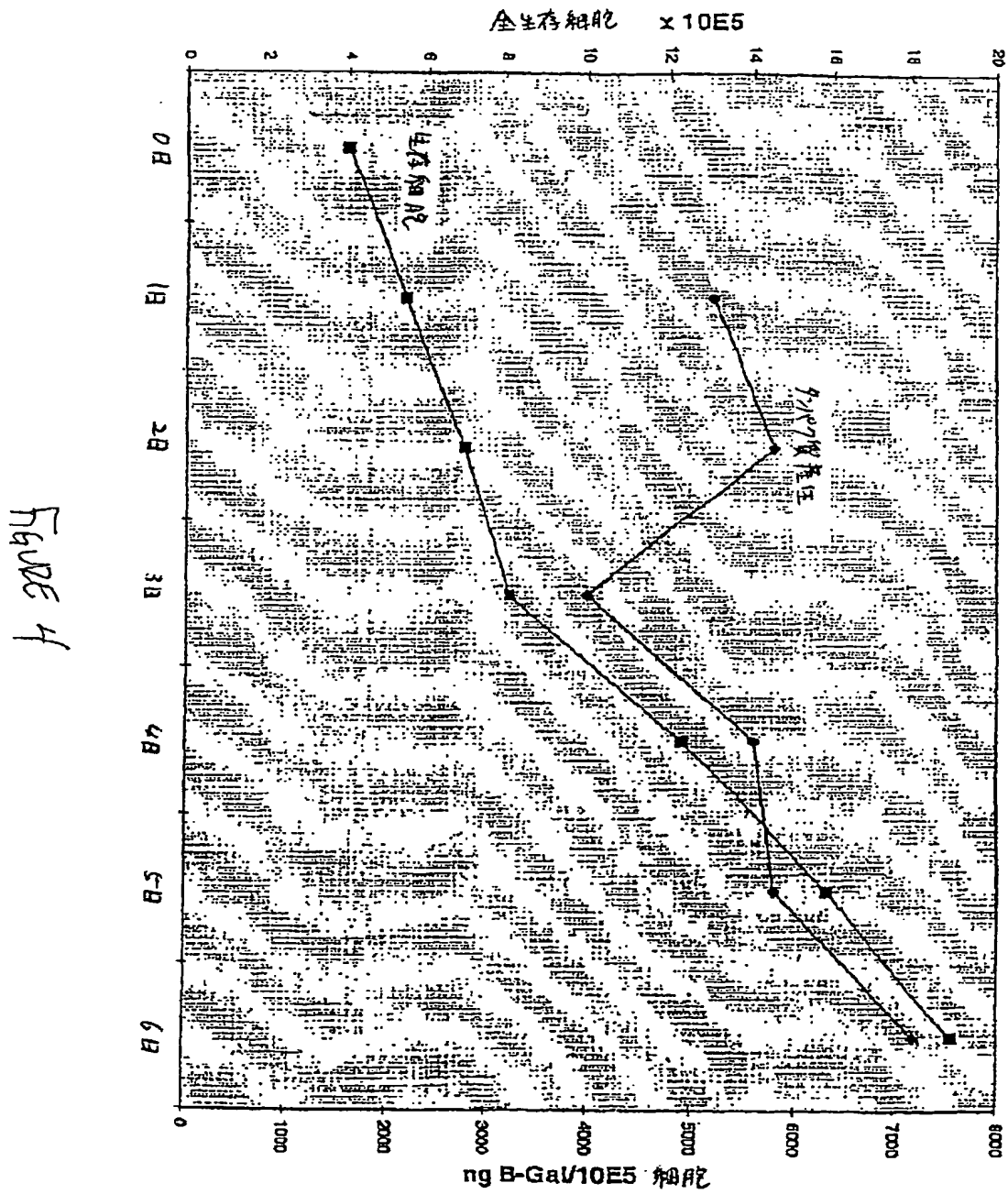


FIGURE 3

【图4】



【図5】

FIGURE 5A

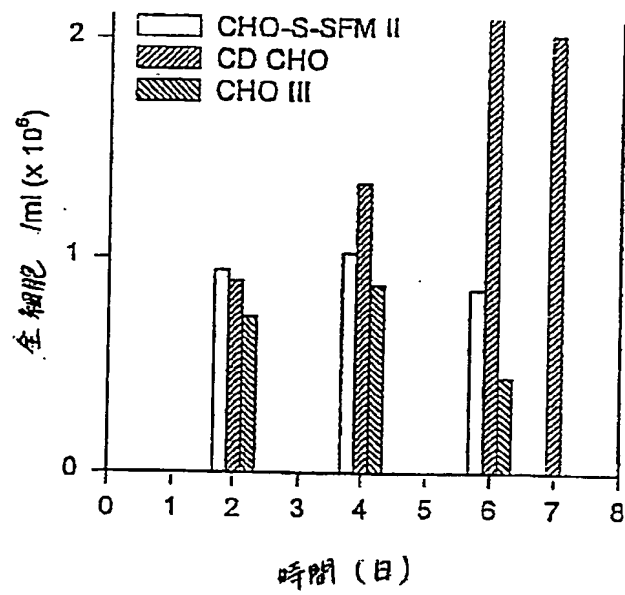
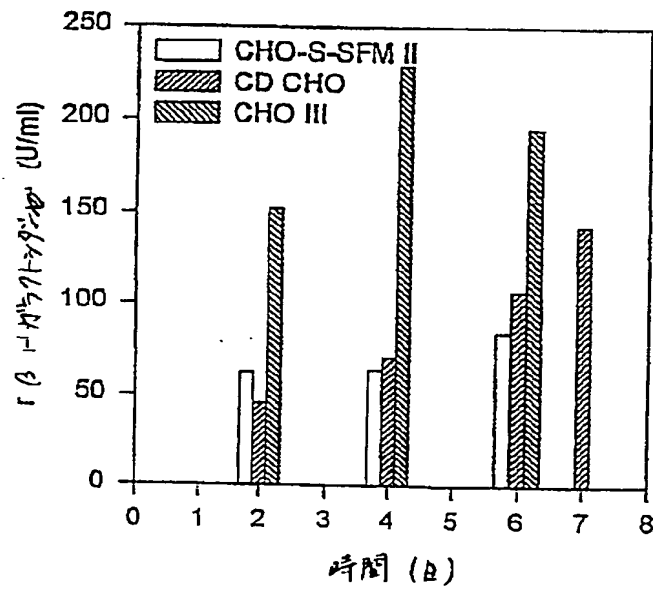


FIGURE 5B



【図6】

FIGURE 6A

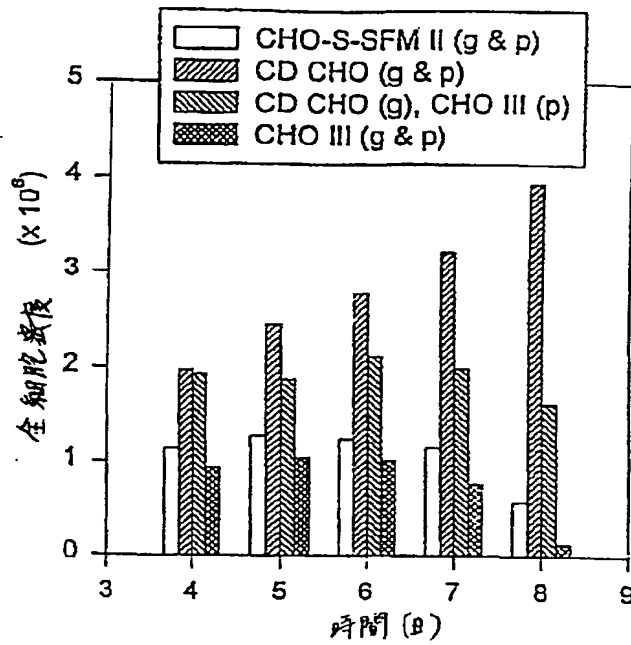
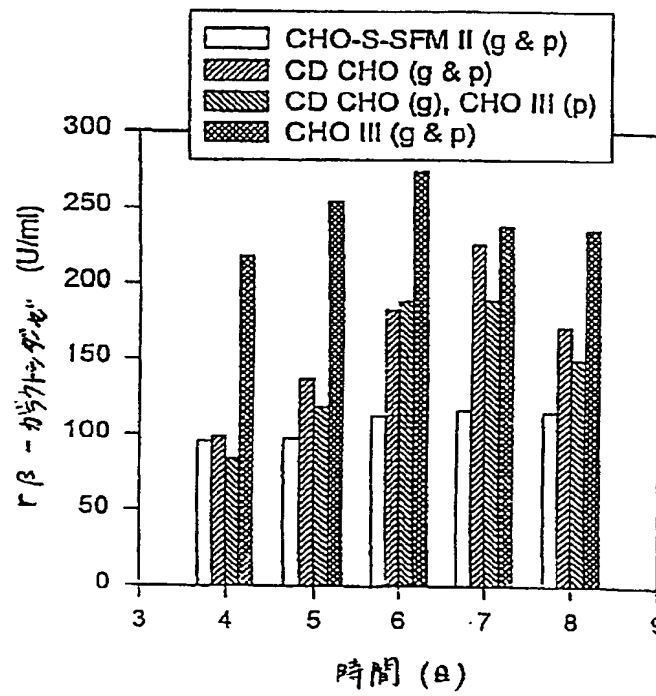


FIGURE 6B



【図7】

FIGURE 7A

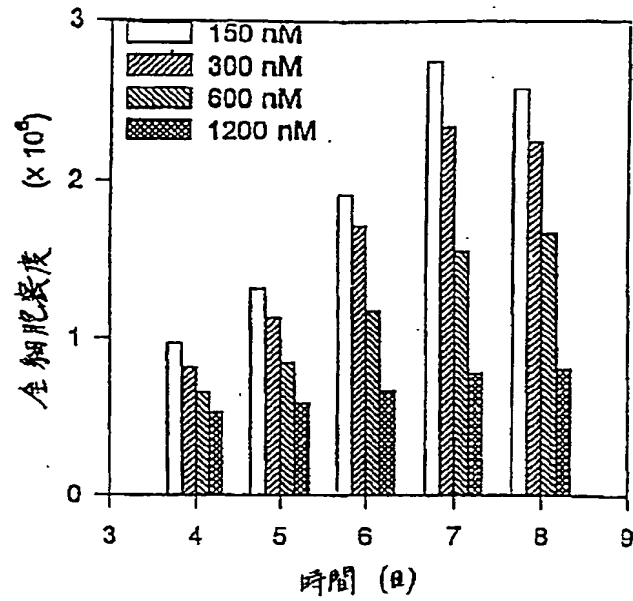
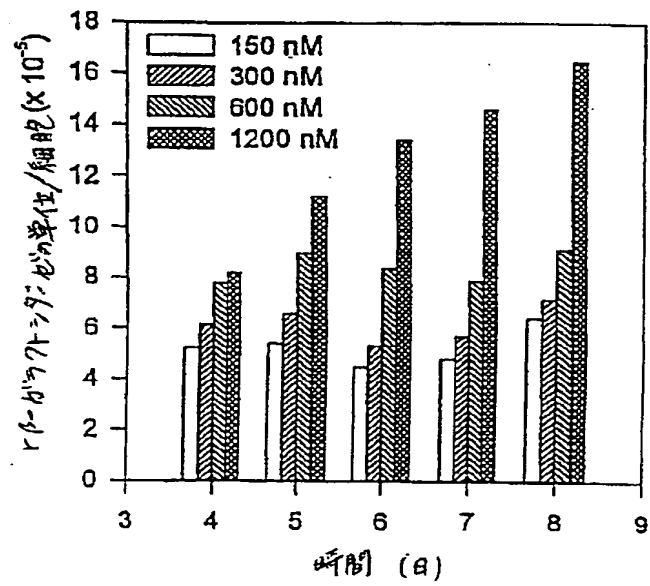


FIGURE 7B



【図8】

FIGURE 8A

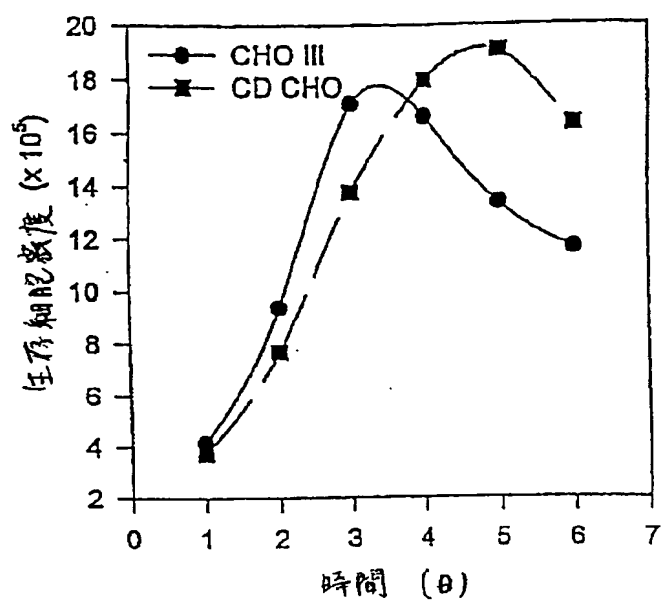
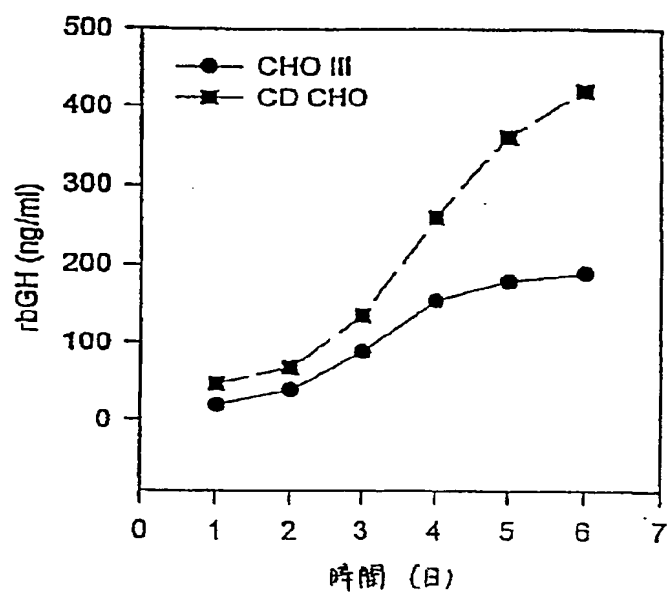


FIGURE 8B



【図9】

FIGURE 9A

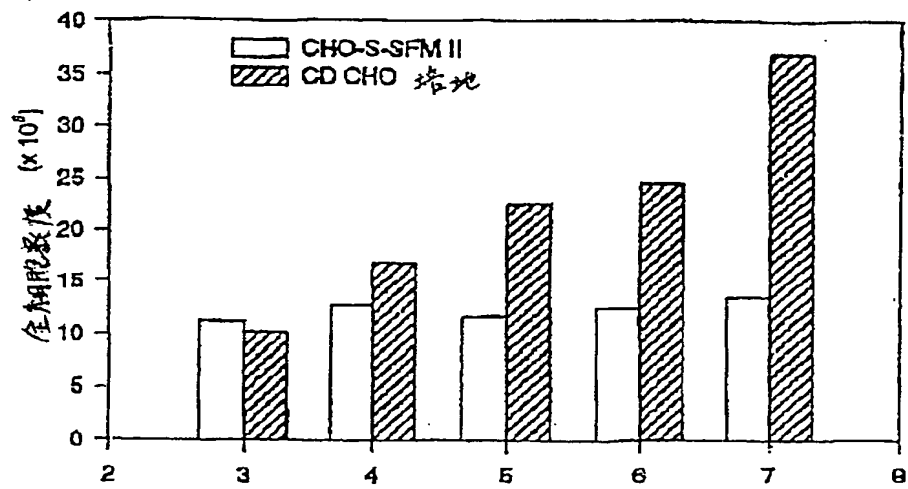
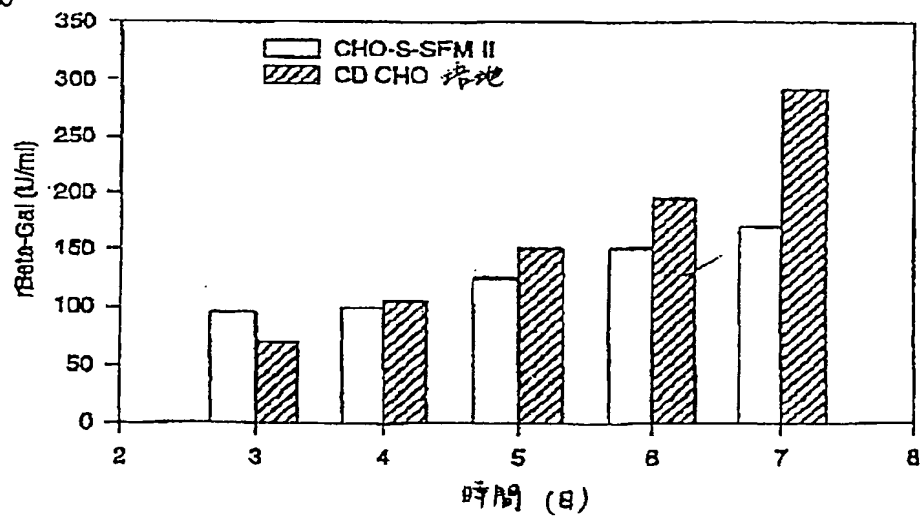
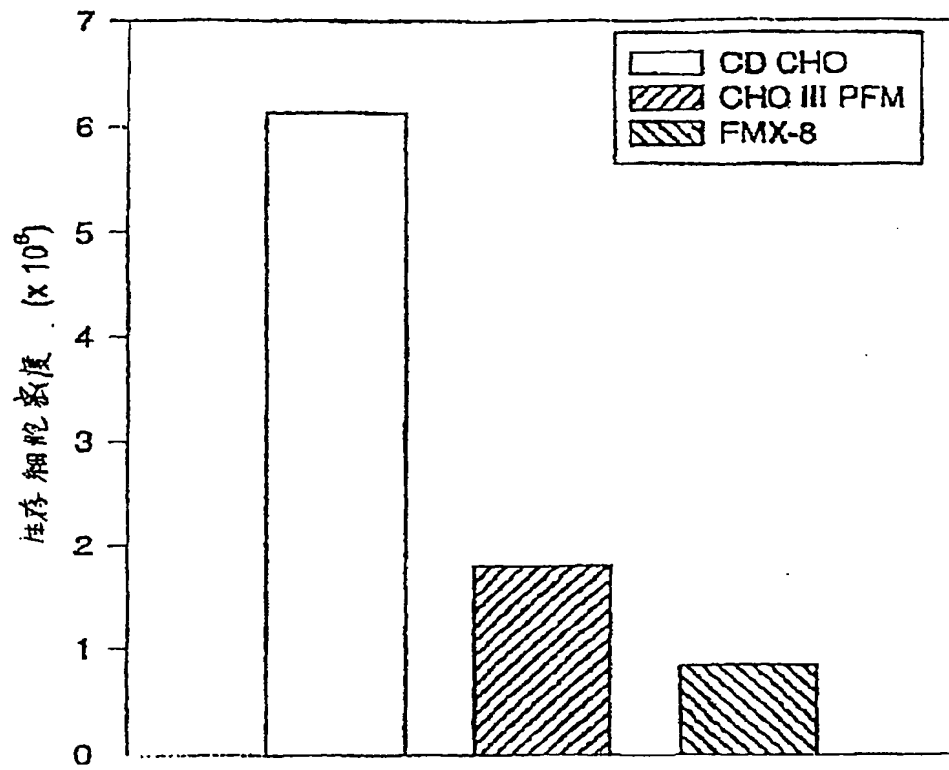


FIGURE 9B



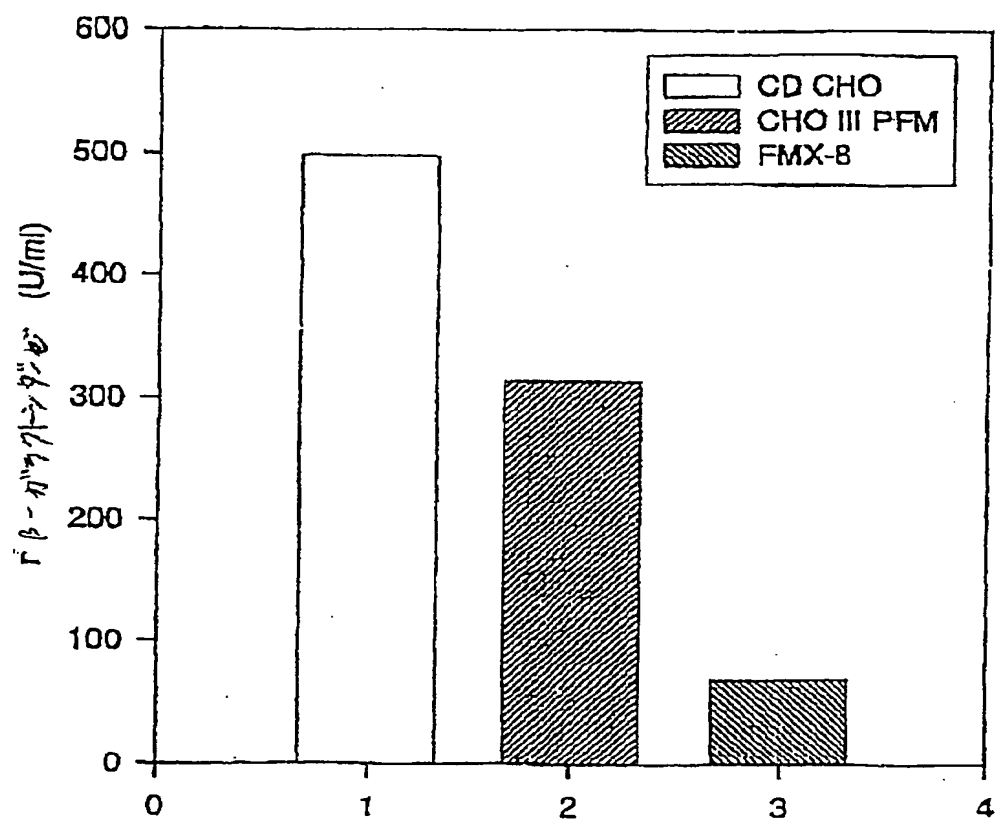
【図10】

Figure 10



【図11】

Figure 11



【図12】

FIGURE 12A

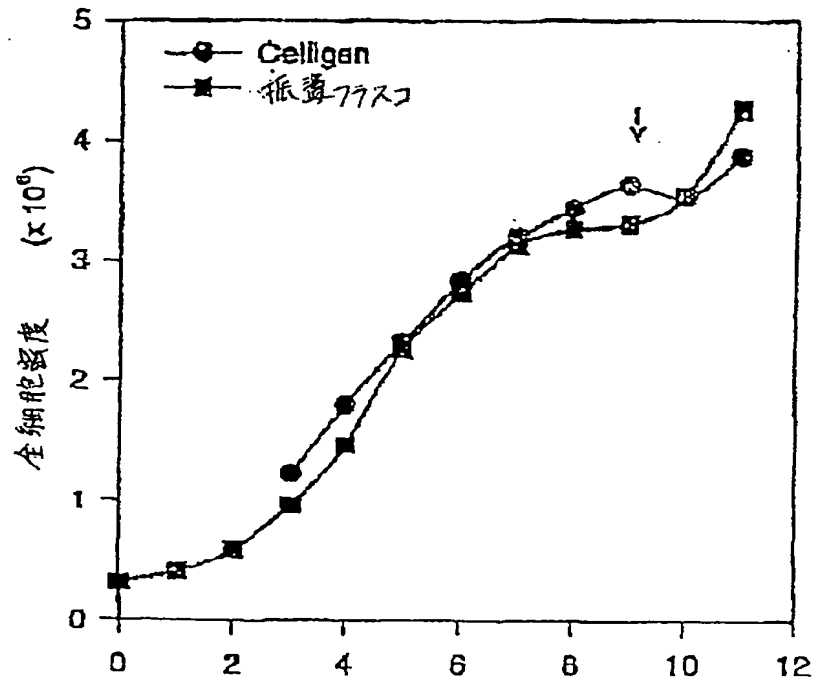
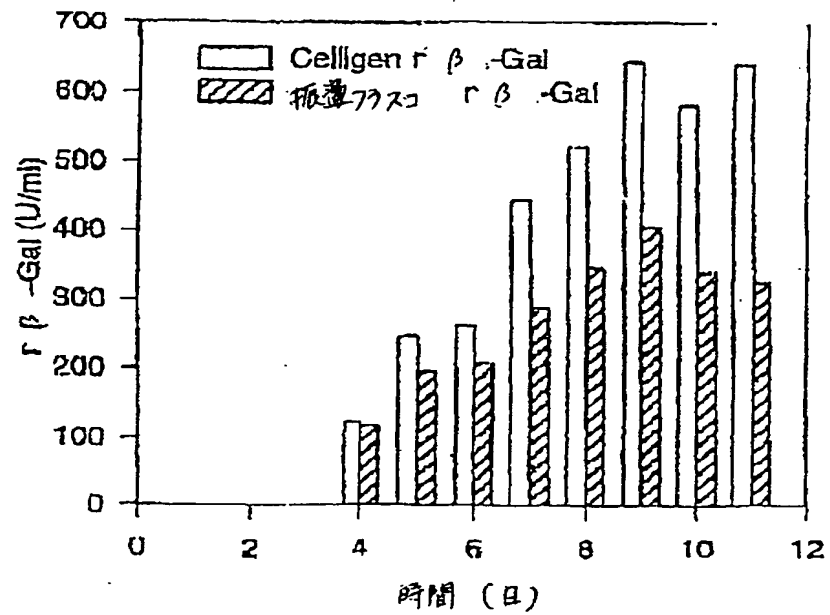
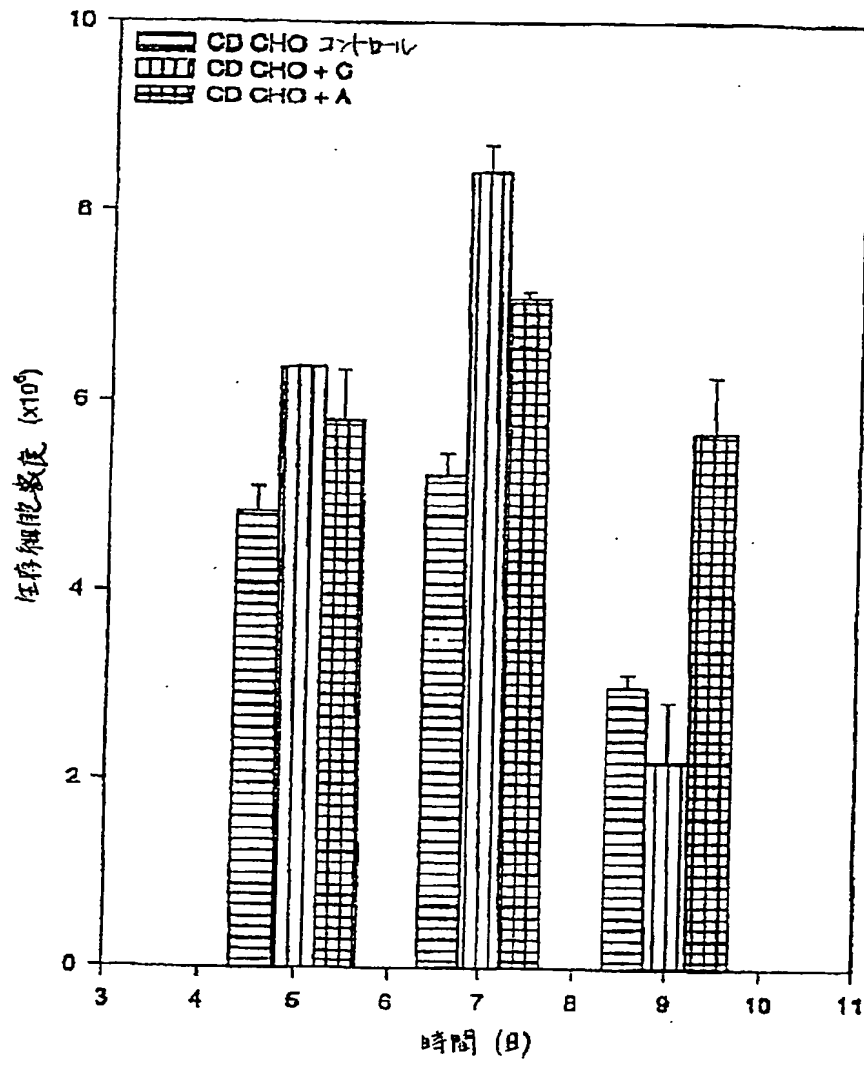


FIGURE 12B



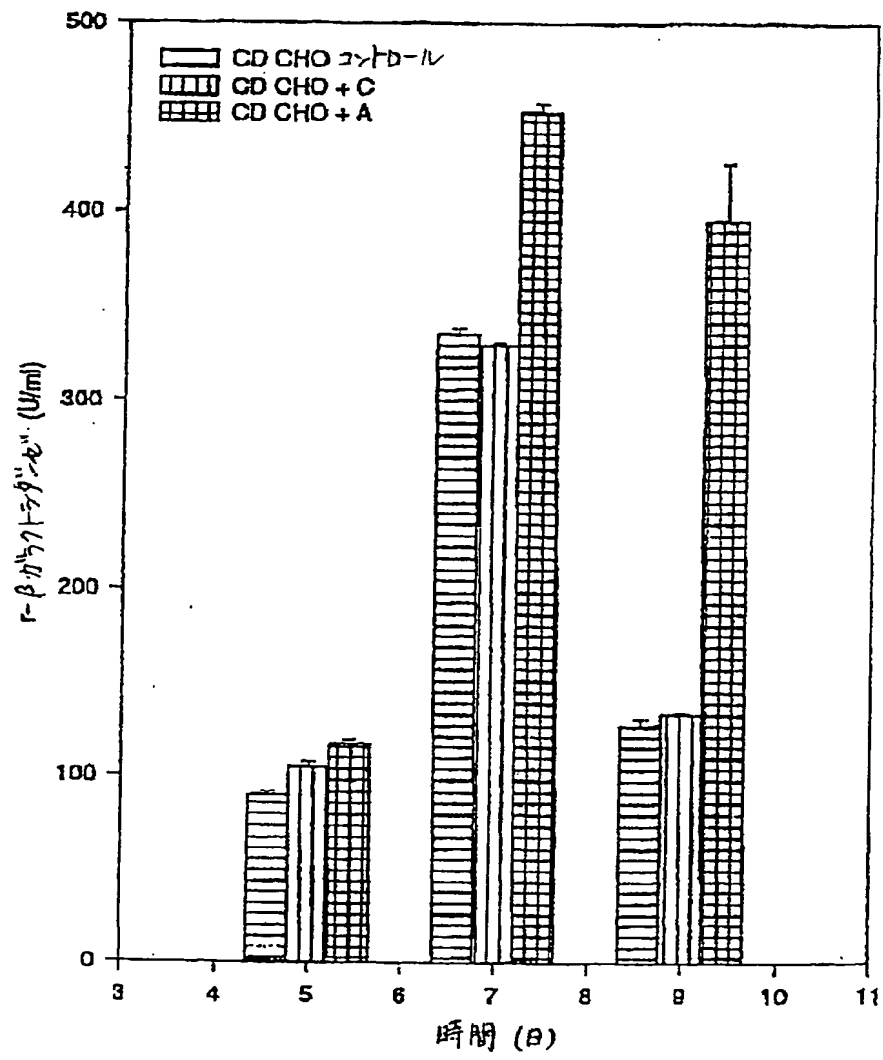
【図13】

Figure 13



【図14】

Figure 14



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US97/15296

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C12N 5/00, 5/02, 5/06, 5/08, 5/10

US CL : 433/325, 366, 358, 404

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 433/325, 366, 358, 404

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, REGISTRY, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS, WPI/DS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 92/05246 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 02 April 1992, see entire document, especially pages 2 and 3-5.	30-37, 84, 86-92, 106, 113, 122, 129, 131 90-97, 99-105, 107-112, 114-128

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
B earlier document published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A*	document member of the same patent family
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

15 DECEMBER 1997

Date of mailing of the international search report

10 FEB 1998

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

SUSAN HANLEY

Telephone No. (703) 305-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US97/15296

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 4,959,319 A (SKELNIK ET AL) 25 September 1990, see entire document, especially col. 6, lines 34-68.	1-4, 6-9, 12, 13, 16-18, 20-21, 27- 29, 38-43, 46-47 10, 11, 22-24, 30, 32, 35, 48-51, 55, 57, 59, 62-64, 93- 93, 98-103, 105, 107-110, 112, 114-117, 123-126, 128, 139
X - Y	US 5,063,157 A (STOCKINGER) 05 November 1991, see entire document, especially col. 1, lines 52-68 and col. 2, lines 1-55.	1-3, 7-11, 14, 30, 35, 37, 48-50, 55, 59-61, 62-64, 67, 69, 70 12, 14-17, 20-24, 27, 38-42, 46, 47, 93-95, 98-102, 105, 107-109, 112, 114-116, 123-125, 128, 133-136
X - Y	US 5,045,454 A (BERTHEUSSEN) 03 September 1991, see entire document, especially col. 11, lines 10-60 and col. 22, lines 5-45.	84-92, 98, 99, 105, 106, 112, 113, 119-122, 128-132 93-96, 100-104, 107-111, 114-118, 123-127, 133-139
X - Y	US 5,422,250 A (MIGNOT ET AL) 06 June 1995, see entire document, especially col. 3, lines 1-68, col. 4, lines 1-50 and claims 1-4.	1-72, 139 73-79, 93, 94-96, 100-104, 107-111, 114-118, 123-127, 133-138
Y	US 5,024,947 A (INLOW ET AL) 18 June 1991, see entire document, especially col. 8, lines 24-68 and col. 9, lines 105.	1-139

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US97/15296

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages.	Relevant to claim No.
Y	MAURER, H.R. "Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture." In: Animal cell culture; a practical approach. Edited by: R.I. Freshney. Oxford: Information Printing, 1986, pages 13-31, especially pages 23-25.	1-139

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ファイク, リチャード エム.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 14031,
クラレンス, ハンティング バレー ロー
ド 9310

(72)発明者 ジミアン, ジョイス エル.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 14043,
デピュー, ローレイ ロード 532

(72)発明者 ゴッドウィン, グレン ピー.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 14120,
ノース トナワンダ, クレイグ ドライブ
3296

(72)発明者 プライス, ボール ジェイ.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 14072,
グラント アイランド, ディアウッド レ
ーン 230

(72)発明者 エプスタイン, デイビッド エイ.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 14051,
イースト アムハースト, シャディー グ
ローブ ドライブ 7

(72)発明者 グラバー, デイル
アメリカ合衆国 ニューヨーク 14051,
イースト アムハースト, ケシャイアー
レーン 92

(72)発明者 マックルアー, ドン
アメリカ合衆国 インディアナ 46256,
インディアナポリス, マラード ウェイ
7816